

THROMBOZYTENFUNKTIONSTESTUNG BEI HÄMOPHILIE A

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

VORGELEGT VON

FRANK BERGMANN

1979

1980

Aus der Kinderklinik B der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. E. Schmidt

Thrombozytenfunktionstestung
bei Hämophilie A

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frank Bergmann

1979

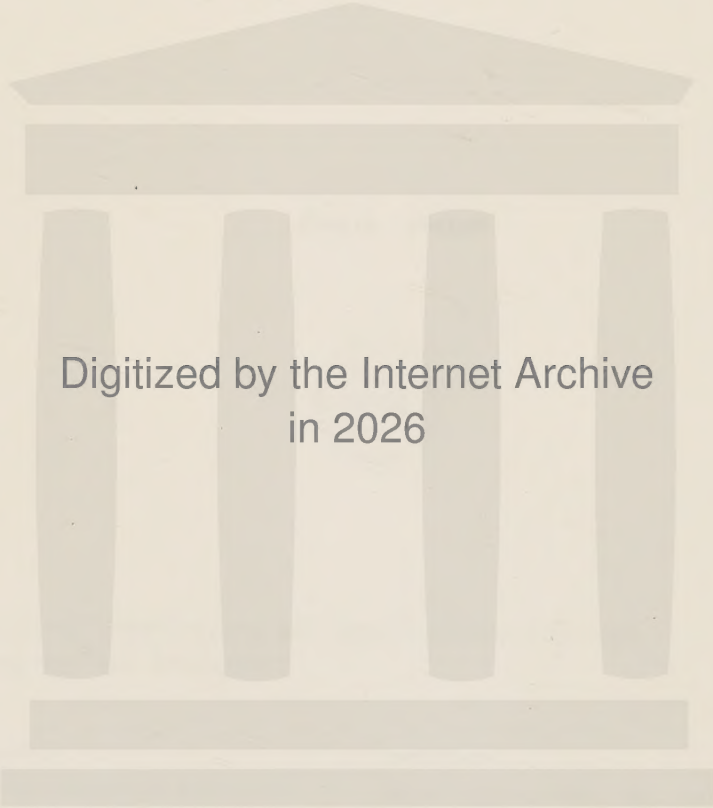


Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez. Prof. Dr. Krüskemper

Referent
gez.: Priv.-Doz. Dr. von Voss
Korreferent
gez. Prof. Dr. Schneider

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533924_0017

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung
- 1.1. Zur Bluterkrankheit
- 1.2. Thrombozytenfunktionsstörungen bei der Bluterkrankheit
- 1.3. Bedeutung der Prostaglandinsynthese von Thrombozyten für die primäre Hämostase
- 1.4. Prostaglandine und Lipidperoxidation
- 1.5. Zur Entwicklung der von uns angewandten Methode zur Bestimmung der Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten
2. Methodik und Auswahl der Probanden
- 2.1. Methodik
- 2.1.1. Messung der Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten
- 2.1.2. Thrombozytenfunktionstests und Bestimmung plasmatischer Gerinnungsfaktoren
- 2.1.3. Statistische Untersuchungen
- 2.2. Auswahl der Probanden
3. Ergebnisse
- 3.1. Methodische Untersuchungen zur Messung der MDA-Produktion von Thrombozyten
- 3.1.1. Abhängigkeit der Meßergebnisse von der Lagerungstemperatur des plättchenreichen Plasmas
- 3.1.2. Abhängigkeit der Meßwerte vom Probenvolumen
- 3.1.3. Abhängigkeit der Messung von der Thrombinkonzentration
- 3.2. MDA-Produktion von Thrombozyten und weitere Thrombozytenfunktionstests bei 19 Kindern mit Hämophilie A
- 3.2.1. Thrombin-induzierte MDA-Produktion von Thrombozyten

- 3.2.2. Thrombozytenfunktionstests bei Hämophilie A
- 3.3. Bestimmung plasmatischer Gerinnungsfaktoren
- 3.4. Korrelationen
- 4. Diskussion
- 4.1. Zur Bestimmungsmethode der MDA-Produktion von Thrombozyten
- 4.2. Zu den Untersuchungsergebnissen bei Patienten mit Hämophilie A
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis
- 7. Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1. Zur Bluterkrankheit

Die Bluterkrankheit ist eine angeborene Defektkoagulopathie mit rezessiv X-chromosomalem Erbgang. Daher manifestiert sich das Leiden fast ausschließlich beim männlichen Geschlecht. Die Häufigkeit beträgt etwa 1 zu 4000 Knabengeburten (13).

Entsprechend dem Mangel an Faktor VIII - bzw. Faktor IX-Aktivität im endogenen Gerinnungssystem unterscheidet man die Hämophilie A von der Hämophilie B, wobei die Hämophilie A fünfmal häufiger auftritt (13).

Die Bluterkrankheit ist in der Regel durch eine Verlängerung der Gerinnungszeit bei normaler Blutungszeit gekennzeichnet. Charakteristisch für das Krankheitsbild sind Gelenk- und Muskelblutungen, wobei die stark belasteten Gelenke (Knie-, Sprung- und Ellenbogengelenk) besonders häufig betroffen sind. Als Folgen treten schmerzhaftes Schwellungen mit Bewegungseinschränkung auf. Bei Nichtbehandlung kommt es zu einer sekundären Schädigung des Knorpels, in deren Folge sich eine bindegewebige oder knöcherne Ankylosierung ausbilden kann.

Die spezifische Therapie besteht in der Substitution von Faktor VIII:C - haltigen Konzentraten, bereits bei den ersten Anzeichen einer beginnenden Blutung (1).

1.2. Thrombozytenfunktionsstörungen bei der Bluterkrankheit

Wie in der Literatur berichtet und von der praktischen Erfahrung her bekannt, kann es bei Patienten mit Hämophilie zu einer "paradoxen" Blutungsneigung unter der Substitution von Faktor-VIII-haltigen Konzentraten kommen (5, 22, 31, 64). Es wurde vermutet, daß besonders Fremdeiweiß solche Blutungssymptome auslöst, wobei unklar ist, ob das Fibrinogen hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Die Untersuchungen von GADNER und Mitarb. (22) zeigten eine pathologische Thrombozytenfunktion bei zwei Patienten mit Hämophilie unter hoher Substitution mit Faktor-VIII-haltigen Konzentraten. Diese Beobachtung war für uns der Anlaß zu prüfen, ob unabhängig von der Substitution bei Patienten mit Hämophilie eine Thrombozytenfunktionsstörung vorliegt, die eine solche "paradoxe" Blutungsneigung erklären könnte.

Bereits einige andere Untersucher wiesen Veränderungen der Thrombozytenfunktionen bei Patienten mit Hämophilie nach, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind. Eine sichere Aussage über das Vorliegen einer Beeinträchtigung der primären Hämostase - somit der Thrombozytenfunktion - war bislang nicht möglich, da bei den meisten Untersuchungen nur ein kleines Spektrum an Thrombozytenfunktionstests durchgeführt wurde.

Tabelle 1 : Thrombozytenfunktionsstörungen bei der Bluterkrankheit nach Angaben aus der Literatur

AUTOR	JAH	ART DER STÖRUNG	
JÜRGENS (34)	1952	VERMINDERTE THROMBOKINASE	1
FONIO (19)	1956	VERZÖGERTE AGGLUTINATBILDUNG	3
		VERZÖGERTER GESTALTWANDEL	1
FONIO (20)	1959	VERMINDERTE RETRAKTION	
BRÜSTER (10)	1962	ERHÖHTE OSMOTISCHE RESISTENZ	
(4)		Pf-3-FREISETZUNGSSTÖRUNG	
MUSTARD (45)	1966	VERLÄNGERTE PLÄTTCHENÜBERLEBENSZEIT	
PAVLOVSKY (51)	1966	ERHÖHTE KÄLTRESISTENZ DER THROMBOZYTEN	
RIECH (53)	1968	GESTEIGERTE THROMBOZYTENAGGREGATION	
CALL (11)	1969	VERMINDERTE PLÄTTCHENADHÄSIVITÄT	
KUNZ (39)	1972	VERMINDERTER GEHALT AN PHOSPHOLIPOIDEN	
WALSH (76)	1973	VERMINDERTE PROKOAGULANTAKTIVITÄT DER PLÄTTCHEN	
WEISSBACH (78)	1973	VERMINDERTES PLÄTTCHENVOLUMEN	
GADNER (22)	1977	HEMMUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN THROMBOZYTEN- AGGREGATION	

(nach VOSS, H. von und Mitarb. (72)

Um neue Aufschlüsse über die bei der Hämophilie A möglicherweise vorhandenen Thrombozytenfunktionsstörungen zu erlangen, erstellten wir ein umfassendes Thrombozytenfunktionstestprogramm bei gleichzeitiger Untersuchung der plasmatischen Gerinnung. Es war auch unser Ziel herauszufinden, ob es einen allen Bluterkranken gemeinsamen Thrombozytenfunktionsdefekt gibt oder welcher Test - und damit welche Thrombozytenfunktion - am häufigsten pathologische Ergebnisse zeigt.

Da in letzter Zeit die Bedeutung der Prostaglandine für die Thrombozytenfunktion und die Gefäßwandreaktion bei der Gerinnung bekannt geworden ist, führten wir die Messung der Malonyldialdehydproduktion der Thrombozyten in unser Testprogramm ein, da diese relativ leicht durchführbare Untersuchung einen indirekten Rückschluß auf die Prostaglandinsynthese der Blutplättchen zuläßt (60).

1.3. Bedeutung der Prostaglandinsynthese von Thrombozyten für die primäre Hämostase

Die Blutplättchen garantieren die primäre Hämostase. Im Rahmen einer Gefäßverletzung werden sie in dem geschädigten Gefäßabschnitt wandhaftend (Adhäsivität) und aggregieren schließlich (Aggregation). Während dieser Vorgänge werden Substanzen freigesetzt, die einerseits die Aggregation selbst fördern (ADP), andererseits auf die Gefäßwand wirken (z.B. Serotonin). Auch Prostaglandine, Thromboxane und somit gleichfalls zyklische Endoperoxide spielen bei der Induktion der primären Hämostase eine wichtige Rolle (56,60). Die Entstehung der in diesem Zusammenhang wichtigsten Substanzen und ihrer Wirkungen ist stark vereinfacht in

Abbildung 2 dargestellt und wird im einzelnen im folgenden Text erläutert.

Thrombin, Kollagen und andere aggregationsauslösende Substanzen führen durch die Aktivierung der Phospholipase A zur Freisetzung von Arachidonsäure aus den in den Thrombozyten vorhandenen Phospholipiden (28, 44, 55, 60, 80). Zwei verschiedene Enzymsysteme katalysieren die Bildung zyklischer Endoperoxide aus der Arachidonsäure (26) (siehe Abbildung 2). Durch die Lipoxygenase entsteht HETE (12L-Hydroxy-5,8,10,14-Eicosa-Tetra-Enolsäure), deren einzige bisher bekannte Wirkung auf der Begünstigung der Chemotaxis für neutrophile Granulozyten beruht (59).

Abbildung 1 : Wirkung der Prostaglandine und Thromboxane
auf die Hämostase

Aggregations - Induktoren

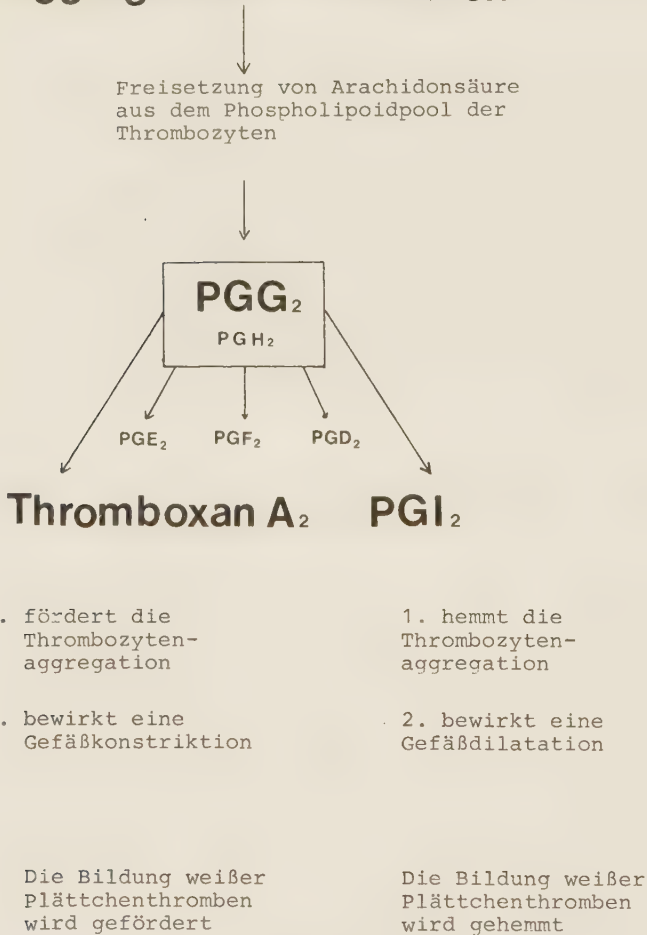
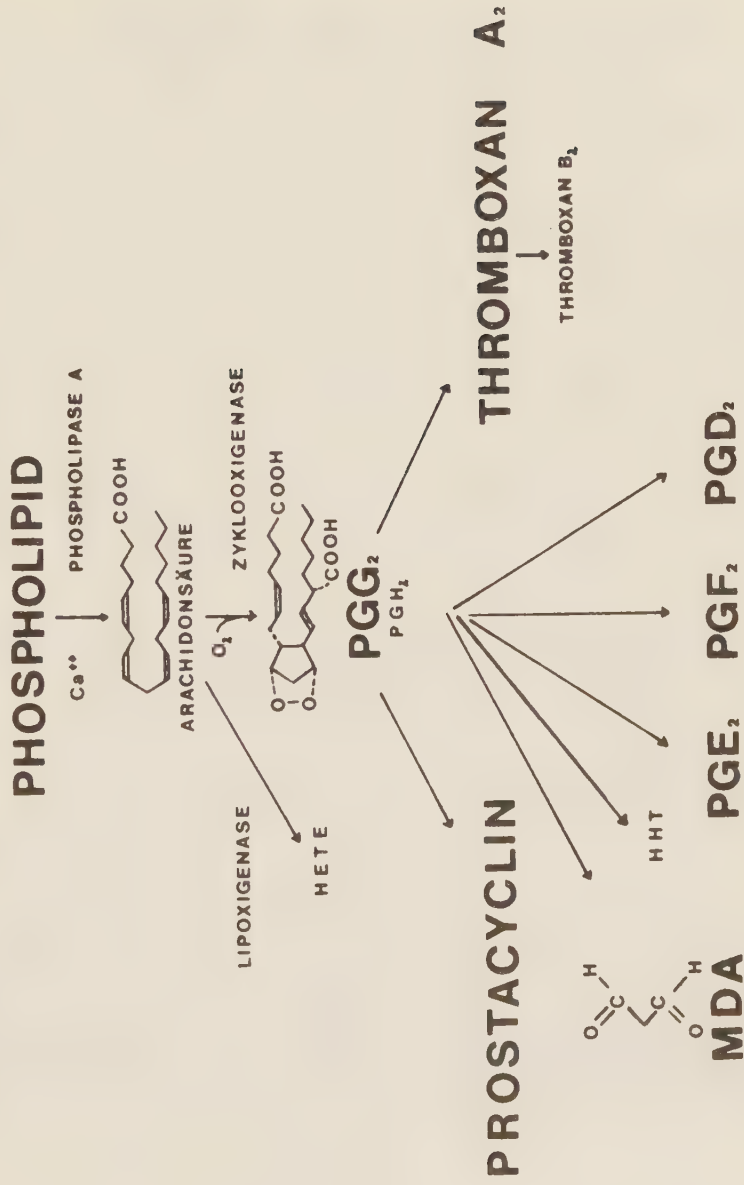


Abbildung 2 : Prostaglandinsynthese aus Phospholipiden der Blutplättchen



Durch die Zyklo-Oxygenase wird die Bildung von Prostaglandin PGG_2 katalysiert. PGG_2 und das aus ihm entstehende PGH_2 nehmen eine zentrale Stellung im Prostaglandinstoffwechsel der Thrombozyten ein, da aus ihnen einerseits die stabilen Prostaglandine PGE_2 , PGF_2 und PGD_2 , andererseits die Thromboxane und das Prostacyclin (PGI_2) entstehen (56,58).

Malonyldialdehyd ist ein direktes Abbauprodukt von PGG_2 (siehe Abbildung 2) und läßt damit wichtige Schlüsse auf die Verfügbarkeit der Arachidonsäure aus den Blutplättchen einerseits sowie auf das Ausmaß der Prostaglandinsynthese andererseits zu (16).

Der entscheidende Schritt für die Auslösung der Aggregation scheint die Freisetzung von Arachidonsäure in vivo aus dem Phospholipoiddepot der Thrombozyten zu sein, was durch Kollagen, Thrombin und andere Substanzen induziert werden kann (56). Ein spezifisches, zellständiges Multienzymsystem (43) wandelt die Arachidonsäure zu den zyklischen Endoperoxyden (PGG_2 , PGH_2) und zu Thromboxan A_2 um (56). Die zyklischen Endoperoxyde und / oder das Thromboxan A_2 sind essentiell für die Thrombozytenaggregation und die Plättchenfreisetzungsreaktion (release reaction) (40), bei der ADP, Serotonin und Ca^{++} aus Granula der Thrombozyten an die Umgebung der Blutplättchen abgegeben werden (23,33). Noch nicht entschieden ist, ob die Thrombozytenaggregation direkt durch den Einfluß der Prostaglandine oder indirekt über die Plättchenfreisetzungsreaktion zustande kommt (23,56). Offen ist ferner die Frage, ob die zyklischen Endoperoxyde (PGG_2 , PGH_2), das Thromboxan A_2 oder beide für die Aggregation und Freisetzungsreaktion der Blutplättchen verantwortlich sind (56).

Neben der aggregationsfördernden Wirkung beeinflussen PGG_2 , PGH_2 und Thromboxan A_2 die glatte Muskulatur der Gefäße. Sie bewirken eine Vasokonstriktion (17,56). PGI (Prostacyclin, PGX), das wahrscheinlich durch Diffusion von zyklischen Endoperoxyden in die Gefäßwand und dortige enzymatische Umwandlung entsteht, ist in jeder Hinsicht ein Antagonist von PGG_2 , PGH_2 und Thromboxan A_2 . Es hemmt die Aggregation der Blutplättchen und führt zur Vasodilatation (27,44).

Die aus den zyklischen Endoperoxyden entstehenden stabilen Prostaglandine sind zeitlich nicht mit dem Beginn der Freisetzungsreaktion (release reaction) und der Thrombozytenaggregation korreliert, sind aber ebenfalls in der Lage, diese zu beeinflussen. Ihre zum Teil gegensätzlichen Wirkungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt (17,25).

Tabelle 2 : Wirkung der stabilen Prostaglandine auf die Thrombozytenaggregation, den Gefäßtonus sowie die Gefäßpermeabilität

Prostaglandin	Thrombozytenaggregation	Gefäßtonus	Gefäßpermeabilität
PGE_1 , PGE_2			
in niedriger Konzentration	fördert		Dilatation erhöht
in hoher Konzentration	hemmt		
PGF_2	fördert	Konstriktion	erniedrigt
PGD_2	hemmt	(Dilatation)	(erhöht)

1.4. Prostaglandine und Lipidperoxidation

Als die Prostaglandinsynthese der Thrombozyten noch nicht bekannt war, bezeichneten OKUMA und Mitarb.(49) und andere Autoren den Vorgang, bei dem als Nebenprodukt Malonyldialdehyd (MDA) entstand, als "Lipidperoxidation".

Nach den heutigen Erkenntnissen sollte diese Bezeichnung nicht mehr verwendet werden, da die Lipidperoxidation auch einen nicht enzymatischen Vorgang darstellen kann, der nicht identisch mit den Vorgängen bei der Prostaglandinsynthese ist (44).

Noch unter dem Begriff der Lipidperoxidation, die auf Grund der MDA-Produktion der Thrombozyten bestimmt wurde, veröffentlichten OKUMA und Mitarb. (49) , daß so verschiedene Substanzen wie Calcium-, Magnesium- und Eisenionen, ferner Thrombin sowie Glutathion inhibierende Substanzen (N-Äthylmaleinimid) die Thrombozyten zur Bildung von MDA und zur Aggregation veranlaßten.

Von anderen Autoren wurde eine erhöhte MDA-Produktion mit dem Altern von Erythrozyten (62) und Thrombozyten (47) in Zusammenhang gebracht, ferner bei Vitamin-E-Mangel, Hyperlipämie und Arteriosklerose beobachtet (58).

1.5. Zur Entwicklung der von uns angewandten Methode zur Bestimmung der Malonyldialdehydproduktion von Thrombozyten

Die Entwicklung der Meßmethode geht auf KOHN und LIVERSEDGE (37) zurück und wurde von zahlreichen Autoren (2,12,50,52,79) modifiziert.

Sie beruht auf der Tatsache, daß Malonyldialdehyd (MDA) einen rotgefärbten Komplex mit 2-Thiobarbituratsäure bildet, der photometrisch bestimmt werden kann. Diese photometrische MDA-Messung kann als spezifisch angesehen werden, da andere chromogene Substanzen wie aromatische Aldehyde und Ketone instabil sind und wegen ihres andersartigen Absorptionsmaximums bei der MDA-Bestimmung nicht erfaßt werden (47).

OKUMA, STEINER und BALDINI (47,48,49) führten als erste die Messung der MDA-Produktion von Thrombozyten durch. Sie untersuchten dabei Einflüsse von seiten der Temperatur, das pH und der Lagerungsdauer des plättchenreichen Plasmas (PRP) auf die Meßergebnisse der MDA-Produktion von Thrombozyten. Auch die Auswirkungen verschiedener Induktoren und Antikoagulantien auf die MDA-Produktion wurde untersucht.

STUART und Mitarb. (63) modifizierten das von OKUMA und Mitarb. angegebene Verfahren in der Art, wie wir es mit einigen Änderungen für unsere Untersuchungen übernahmen.

Da uns die von STUART und Mitarb. verwendeten Proben volumina in der Kinderheilkunde, insbesondere im Rahmen eines größeren Thrombozytenfunktionstestprogramms unzumutbar erschienen, reduzierten wir das Probenvolumen mit dem Ziel, eine Mikromethode zu entwickeln.

Ferner sollte der Einfluß unterschiedlicher Thrombin-konzentrationen auf die MDA-Produktion der Thrombozyten untersucht werden. Thrombin wurde als Induktor ausgewählt, da seine Wirkung auf die Blutplättchen bisher besonders intensiv untersucht worden ist: Thrombin steigert den Sauerstoffverbrauch der Blutplättchen (21), fördert die Glykolyse und führt zu einer vermehrten Bindung von Glucose an die Thrombozytenmembran (14). Es aktiviert die Phospholipase und bewirkt damit die Freisetzung von Arachidonsäure (55).

2. METHODIK UND AUSWAHL DER PROBANDEN

2.1. Methodik

2.1.1. Messung der Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten

Das methodische Vorgehen bei der Messung der MDA-Produktion richtete sich weitgehend nach der Beschreibung von STUART und Mitarb.(63). Auf unsere Modifikation verweisen wir im Anschluß an die Darstellung des Meßvorganges.

Methodisches Vorgehen:

1. Blutentnahme mit einer Einmalspritze bei gleichzeitiger Verdünnung mit 3,2% Natriumzitratlösung (1:10) aus einer Unterarmvene
2. Durchmischung des Nativblutes mit Zitrat
3. 20 Minuten zentrifugieren der Proben bei 150g
4. Abheben des plättchenreichen Plasmas (PRP), Poolbildung, Durchmischung, Thrombozytenzählung (Methode nach FEISLY und LÜDIN), Bildung von drei Proben zu je 2,0ml PRP in Plastikröhrchen
5. Zentrifugieren der Proben bei 600g über 15 Minuten, wobei plättchenarmes Plasma (PAP) und ein Thrombozytenpfropf entstehen
6. Abheben des PAP, Thrombozytenzählung (PAP 3000 Thromboz./ml)
7. Entfernen wandhaftender Reste von PAP aus den Reagenzröhrchen
8. Resuspension des Thrombozytenpfropfes mit 2,0ml Phosphatpuffer (0,15 M, pH 7,4)
9. Mechanisches Lösen des Thrombozytenpfropfes von der Röhrchenwand und Durchmischung
10. Bezeichnung der Proben
11. Stimulation der MDA-Produktion von Thrombozyten durch Zugabe unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen, die mit Phosphatpuffer auf 100 μ l eingestellt werden;
eine Probe verbleibt ohne Stimulation und gibt einen Anhalt für die MDA-Produktion der Thrombozyten in Abwesenheit von Phosphatpuffer ('Spontanwert')

12. Durchmischen der Proben mit dem Thrombinreagenz
13. Inkubation der verschlossenen Proben in einem Wasserbad bei 37° C über 60 Minuten
14. Unterbrechung der Reaktion durch Zugabe von 2,0ml einer 0,53% 2-Thiobarbitursäure, die in 2,3% Perchlorsäure zubereitet ist (Herstellung und Haltbarkeit siehe bei STUART und Mitarb.(25)); Malonyldialdehyd geht eine Komplexbindung mit Thiobarbitursäure ein
15. Durchmischen der Proben und Umfüllen in Glasröhrchen, um sie 15 Minuten lang in kochendem Wasserbad zu erhitzen.
16. Zentrifugieren bei 600g über 10 Minuten
17. Der Überstand wird abgehoben und im Spektralphotometer (PM-4, Firma Carl Zeiss) bei 532 nm gegen Aqua bidest.gemessen. Der Absorptionskoeffizient beträgt nach STUART und Mitarb.(63) $= 1,37 \times 10^5$.
18. Die Errechnung der MDA-Konzentration in nMol pro 10^9 Thrombozyten erfolgt nach der Formel:

$$c = \frac{\text{Extinktion}}{\text{Thrombozytenzahl} / \mu\text{l PRP} \times 2 \times 1,37} \frac{\text{nMol}}{10^9 \text{ Thromboz.}}$$

Unser methodisches Vorgehen unterschied sich in Folgendem von dem bei STUART und Mitarb. (63) beschriebenen:

1. Zur Herstellung des PRP zentrifugierten wir die Blutproben 20 Minuten und nicht 15 Minuten lang. Dies wurde notwendig, da auch für andere Thrombozytenfunktionstests unseres Programmes PRP nach dieser Zentrifugationsdauer gewonnen wird.

2. Nach unseren Erfahrungen ist bei der Resuspension des fest wandhaftenden Plättchenpfropfes das mechanische Lösen und Homogenisieren ausschlaggebend für eine hinreichend große Reaktionsfläche der resuspendierten Thrombozyten mit dem Thrombin.
3. Ausgehend von 2,0ml-Proben plättchenreichen Plasmas (Makromethode) , wie sie bei STUART und Mitarb. beschrieben sind, arbeiteten wir mit 1,0ml-, 0,5ml- sowie 200,ul-Proben (Mikromethode) und verglichen die Ergebnisse statistisch mit den bei Verwendung von 2,0ml-Proben gewonnenen Ergebnissen. Wir reduzierten dabei die Volumina aller verwendeten Reagenzien um den gleichen Quotienten, einschließlich der Thrombinlösungen. Dadurch wurde gewährleistet, daß die Thrombinkonzentrationen in den Proben genau denen entsprachen, wie sie beim Vorgehen mit 2,0ml-Proben auch verwendet wurden. Aus diesem Grund brauchte kein Umrechnungsfaktor in die Berechnungsformel eingeführt zu werden.
4. Die Mikromethode unterschied sich zusätzlich in drei Punkten von dem methodischen Vorgehen, wie es für die Anwendung größerer Probenvolumina beschrieben worden ist:
 - a) Wir arbeiteten während des ganzen Meßvorganges mit Eppendorfröhrchen, wodurch ein Umfüllen der Lösungen mit den daraus hervorgehenden Ungenauigkeiten vermieden wurde.
 - b) Die Stimulation der MDA-Produktion mit den notwendig kleinen Volumina an Thrombinreagenz (10,ul) hätte zu Ungenauigkeiten geführt. Daher resuspendierten wir den Thrombozytenpfropf nur mit der Hälfte der benötigten Phosphatpufferlösung (100,ul) und benutzen die andere Hälfte, um darin die gewünschte Thrombinkonzentration einzustellen.

c) Um für den photometrischen Meßvorgang ein ausreichendes Volumen zu erhalten, verdünnten wir die photometrisch zu messenden Proben und berücksichtigten dies durch einen Faktor bei der Berechnung der MDA-Konzentration.

5. STUART und Mitarb. stimulierten die MDA-Produktion der Thrombozyten mit Thrombinkonzentrationen von 0,5 und 1,0 IE/ml PRP.

Wir verwendeten darüber hinaus Konzentrationen bis zu 10,0 IE/ml PRP.

2.1.2. Thrombozytenfunktionstests und Bestimmung plasmatischer Gerinnungsfaktoren

Neben der Messung der MDA-Produktion von Thrombozyten wurden bei unseren Patienten mit Hämophilie am gleichen Untersuchungstag eine Reihe weiterer Thrombozytenfunktionstests und zusätzlich Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung durchgeführt. Alle angewandten Tests waren bereits standardisiert. Da es den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, methodische Hinweise zu diesen Tests zu geben, verweisen wir auf die entsprechende Literatur.

Thrombozytenfunktionstests:

Lichtmikroskopische Thrombozytenzählung nach FEISSLY und LÜDIN (15),

Retention nach HELLEM II (32), standardisiert nach NIESSNER (46) und modifiziert von VOSS, v. und Mitarb. (69) ⁺

⁺Thromboscreen-Rot (FIRMA SYSTRON, WIESBADEN)

Retraktion nach BENTHAUS (1),

Ausbreitung nach MARX und Mitarb.(42), modifiziert nach BREDDIN (9),

photometrische Thrombozytenaggregation nach BORN (6,7), unter Anwendung des methodischen Vorgehens nach VOSS,v. und Mitarb. (68,70), induziert mit ADP (4,24 μ Mol/ml), Kollagen (2mg/ml),Thrombin (0,3 IE/ml) und Ristocetin (1mg/ml),

Messung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit (STYPVEN-Methode) nach HARDISTY und HUTTON (29,70,71).

Die Bestimmung plasmatischer Gerinnungsfaktoren erfolgte nach laborüblichen Einphasentests. Durchgeführt wurden: Partielle Thromboplastinzeit (PTT), Thromboplastinzeit (Quick).

Fibrinogen und die Faktoren II (Prothrombin),
V (Proaccelerin),
VII (Proconvertin),
VIII (Antihämophiler Faktor) und
IX (Christmas Faktor) wurden
bestimmt.

2.1.3. Statistische Untersuchungen⁺⁺

Nach dem SPSS-Programm (3) wurden Mittelwerte,Standardabweichungen und empirische Korrelationskoeffizienten bestimmt. Außerdem wurden mehrere Fragestellungen im WILCOXON-Test untersucht. - Der Rangsummentest für unverbundene und verbundene Stichproben nach WILCOXON ist unabhängig von der Normalverteilung und gibt die Gleichheit zweier Erwartungswerte zu einem Niveau von α an.

⁺⁺ Ich möchte an dieser Stelle Herrn Dr.O.Richter für seine freundliche Beratung und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung statistischer Daten danken.

2.2. Auswahl der Probanden

Wir untersuchten 19 Kinder mit Hämophilie A. Die letzte Substitutionsbehandlung mit Faktor VIII lag mindestens 72 Stunden vor der Untersuchung der Thrombozytenfunktionen.

Die Diagnose Hämophilie A und die Abgrenzung zu anderen Krankheitsbildern, insbesondere dem von-Willebrand-Jürgens-Syndrom erfolgte auf Grund der klinischen Symptomatologie, der Analyse des Erbganges, der Bestimmung des Faktor VIII:C und Faktor VIII:RAg, der Blutungszeit sowie der Retention.

Die Häufigkeit der Blutungen lag bei 15 untersuchten Kindern bei mehr als zwölf pro Jahr. Nur drei Patienten klagten über weniger als sechs Blutungen pro Jahr.

Normalwerte für die MDA-Produktion von Thrombozyten wurden bei klinisch gesunden, jugendlichen Probanden erstellt, die in einem 14-tägigen Zeitraum vor der Untersuchung weder Medikamente eingenommen hatten noch an einem Infekt erkrankt waren.

3. ERGEBNISSE

3.1. Methodische Untersuchungen zur Messung der MDA-Produktion von Thrombozyten

3.1.1. Abhängigkeit der Meßergebnisse von der Lagerungstemperatur des plättchenreichen Plasmas

Von einigen Thrombozytenfunktionstests ist bekannt, daß ihre Ergebnisse stark von der Lagerungstemperatur der Meßproben abhängig sind (42,68,70). OKUMA und Mitarb.(48) berichteten dies auch von der Messung der MDA-Produktion der Thrombozyten, wobei sie Ergebnisse nach Lagerung des plättchenreichen Plasmas (PRP) bei 4°C und bei 20°C verglichen.

Um sicher zu gehen, daß bei geringen Unterschieden der Zimmertemperatur nach einstündiger Lagerung des PRP keine größeren Abweichungen in den Meßergebnissen zustande kommen, erstellten wir in zwei Versuchsserien bei 20°C und bei 25°C 'Spontanwerte' (Phosphatpuffer) der MDA-Produktion von Thrombozyten (siehe Tabelle 2). Nach dem Rangsummentest für unverbundene Stichproben (WILCOXON) konnte auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,01$ gezeigt werden, daß in beiden Versuchsanordnungen die gleichen Ergebnisse zu erwarten sind.

3.1.2. Abhängigkeit der Meßwerte vom Probenvolumen

Ausgehend von einem 2,0ml Probenvolumen (PRP), wie es in der Versuchsanordnung nach STUART und Mitarb. (63) beschrieben ist, reduzierten wir die Volumina der Proben auf 1,0ml, 500 µl und schließlich 200 µl PRP (Mikromethode).

In zwei Pilotstudien testeten wir zunächst an unabhängigen Kollektiven die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen der mit 2,0ml- Proben durchgeführten Messung nach STUART und Mitarb. und den Messungen, bei denen wir Probenvolumina von 1,0ml und 500µl verwendeten (Induktion mit 1,0 IE Thrombin pro ml PRP). Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Nach dem WILCOXON-Test konnte gezeigt werden, daß auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,01$ mit den reduzierten Volumina die gleichen Ergebnisse zu erwarten sind wie bei der Verwendung von 2,0ml-Proben.

Tabelle 2: MDA-Produktion von Thrombozyten bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur und einer Lagerungsdauer von 60 Min.

('Spontanwert'=Phosphatpuffer) (nMol / 10^9 Thr.)

Lagerungstemperatur	
20°C	25°C
1,03	0,97
	0,76
0,92	0,99
	1,02
0,93	0,94
	0,67
0,59	0,74
	0,93
0,99	0,92
	0,79
0,79	0,87
	1,06
0,67	0,78
	0,98
0,90	0,55
	1,02
0,57	0,94
	0,59
0,99	1,23
	1,04
$\bar{x}$ 0,84	$\bar{x}$ 0,89
s 0,17	s 0,17
n 10	n 20

Tabelle 3: MDA-Produktion von Thrombozyten (nMol / 10^9 Thr.) in Abhängigkeit vom Probenvolumen

	'Spontanwerte' (Phosphatpuffer)		Thrombinkonzentration 1,0IE pro ml PRP	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
2,0ml-Proben (n=10)	0,84	0,17	1,31	0,15
1,0ml-Proben (n=10)	0,81	0,17	1,27	0,18
500 μ l-Proben (n=20)	0,76	0,18	1,29	0,17

In zwei sich anschließenden Versuchsserien testeten wir anhand von paarigen Stichproben die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen der Versuchsanordnung mit 2,Oml-Proben und dem Vorgehen mit 500 μ l - und 200 μ l-Proben. Das heißt, wir führten bei jedem Probanden gleichzeitig Messungen mit 2,Oml-Proben und mit den an Volumen reduzierten Proben durch (siehe Tabelle 4 und 5).

Anschließend korrelierten wir die entsprechenden Meßwerte. Dabei ergab sich für die Ergebnisse, die mit 500 μ l- und 2,Oml-Proben gewonnen wurden, ein Korrelationskoeffizient von

$$r = 0,90 \quad (p < 0,01).$$

Die Regressionsgerade (vergleiche Abbildung 3) verlief praktisch durch den Nullpunkt ($a=0,01$) und ihre Steigung betrug annähernd gleich eins ($b=1,07$).

Auch diese Ergebnisse bestätigen, daß bei der Reduktion des Probenvolumens um den Faktor vier die gleichen Werte zu erwarten sind wie bei Verwendung von 2,Oml-Proben.

Bei der Mikromethode (200 μ l-Proben) wurde das ursprünglich verwendete Probenvolumen um den Faktor zehn verringert. Auch hierbei korrelierten die Meßwerte noch eng miteinander:

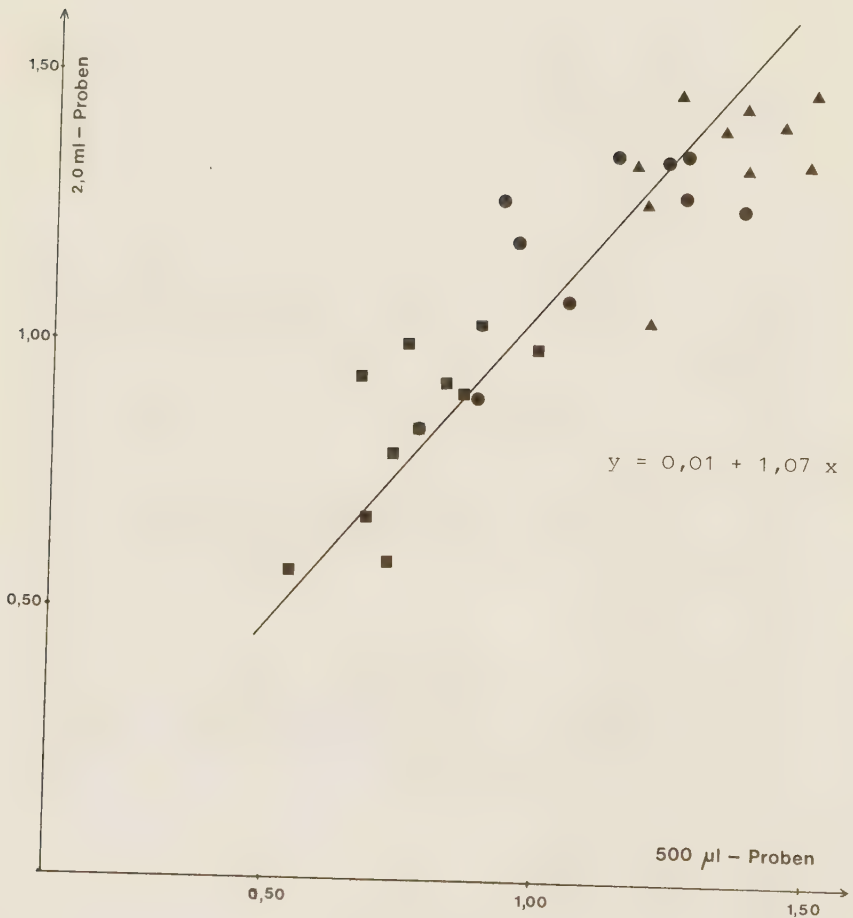
$$r = 0,92 \quad (p < 0,01).$$

Die Gleichung der Regressionsgeraden ($y=0,08 + 1,32$) weist jedoch darauf hin, daß bei Anwendung der Mikromethode die Ergebnisse insgesamt etwas niedriger ausfallen als bei dem Vorgehen mit 2,Oml-Proben (siehe Abbildung 4).

Tabelle 4: MDA-Produktion von Thrombozyten ($\text{nMol}/10^9$ Thrombozyten) in Abhängigkeit vom Probenvolumen (paarige Stichproben)

INDUKTION	'SPONTANWERTE' (PHOSPHATPUFFER)		0,5 IE		THROMBIN/ml	PRP	1,0 IE
	PROBENVOLUMEN	2,0ml	0,5ml	2,0ml	0,5ml	2,0ml	0,5ml
PROBAND							
1		1,03	0,89	1,19	0,95	1,32	1,37
2		0,92	0,83	1,27	0,92	1,33	1,17
3		0,93	0,67	1,08	1,04	1,26	1,19
4		0,59	0,62	0,84	0,78	1,09	1,05
5		0,99	0,76	1,35	1,25	1,46	1,25
6		0,79	0,73	0,90	0,88	1,04	1,20
7		0,67	0,68	1,35	1,13	1,39	1,32
8		0,90	0,86	1,34	1,22	1,44	1,36
9		0,57	0,54	1,25	1,36	1,47	1,50
10		0,99	0,99	1,28	1,26	1,34	1,48
		0,84	0,76	1,19	1,08	1,31	1,29
		0,17	0,18	0,19	0,18	0,15	0,17

Abbildung 3 : Korrelation: MDA-Produktion von Thrombo-
zyten bei Verwendung von 2,0ml - und
500µl-Proben



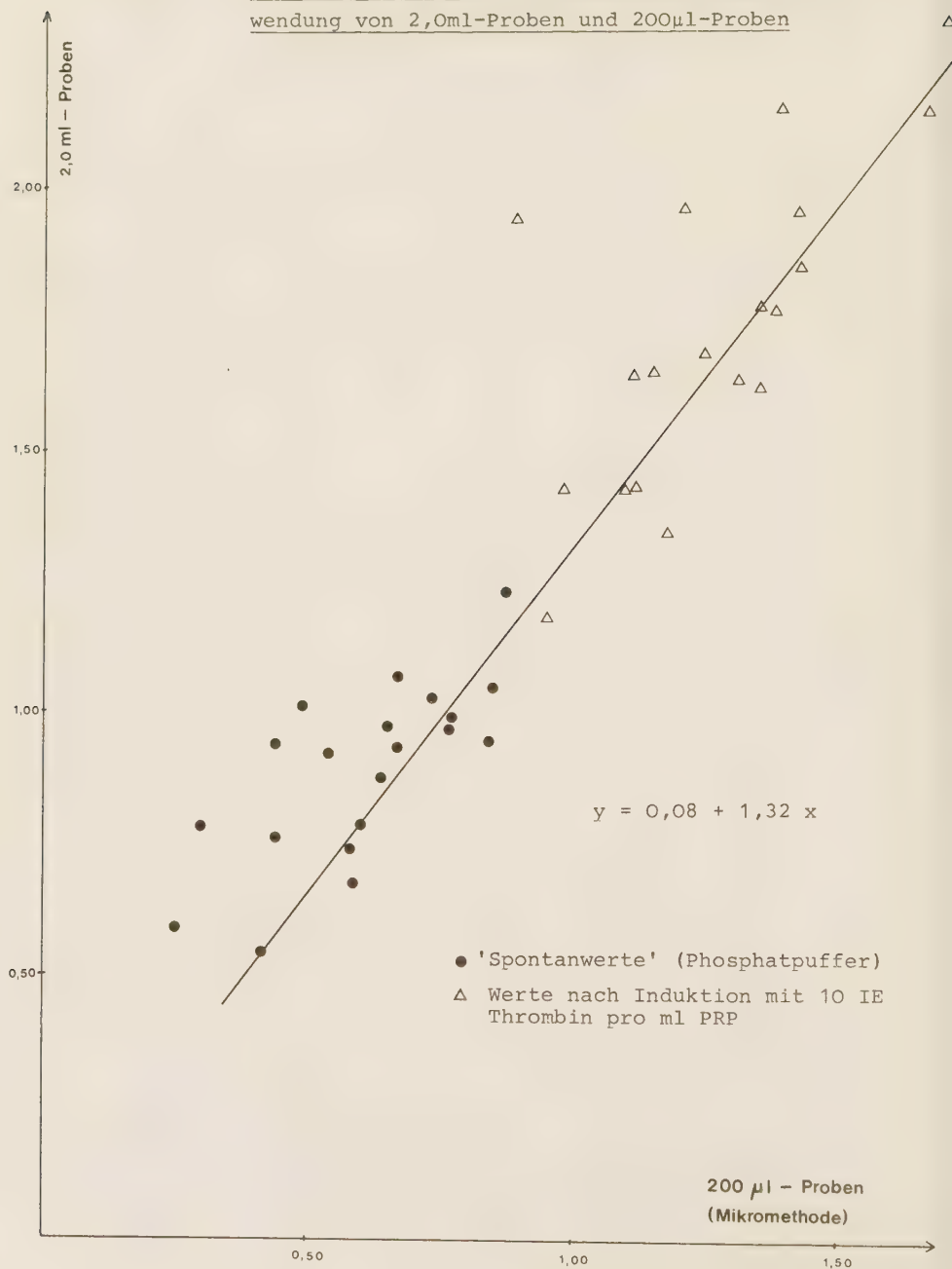
- 'Spontanwerte (Phosphatpuffer)
- Werte nach Induktion mit 0,5 IE Thrombin pro ml PRP
- ▲ Werte nach Induktion mit 1,0 IE Thrombin pro ml PRP

Tabelle 5: MDA-Produktion von Thrombozyten ($\text{nMol}/10^9$ Thrombozyten) in Abhängigkeit vom Probenvolumen (paarige Stichproben)

2,0ml PRP bzw. 200 μ l PRP (Mikromethode)

Induktion	'Spontanwert'		10 IE Thrombin/ml PRP	
	(Phosphatpuffer)			
Probenvolumen	2,0ml	200 μ l	2,0ml	200 μ l
Proband				
1	0,97	0,65	1,62	1,36
2	0,76	0,44	1,68	1,25
3	0,99	0,77	1,77	1,36
4	1,02	0,74	1,63	1,31
5	0,94	0,84	1,43	1,12
6	0,67	0,58	1,42	0,98
7	0,74	0,58	1,85	1,43
8	0,93	0,67	1,34	1,18
9	0,92	0,54	1,64	1,12
10	0,79	0,30	1,77	1,39
11	0,87	0,64	1,95	1,42
12	1,06	0,67	2,30	1,60
13	0,78	0,60	1,43	1,21
14	0,98	0,77	2,14	1,67
15	0,55	0,41	1,96	1,21
16	1,02	0,49	2,14	1,39
17	0,94	0,44	1,94	0,83
18	0,59	0,25	1,18	0,95
19	1,23	0,88	2,12	1,96
20	1,04	0,85	1,65	1,15
$\bar{x}$	0,89	0,61	1,74	1,30
s	0,17	0,15	0,30	0,26

Abbildung 4 : Korrelation: Meßwerte der MDA-Produktion von Thrombozyten (nMol/10⁹ Thrombozyten) bei Verwendung von 2,0ml-Proben und 200µl-Proben



3.1.3. Abhängigkeit der Messung von der Thrombin- konzentration

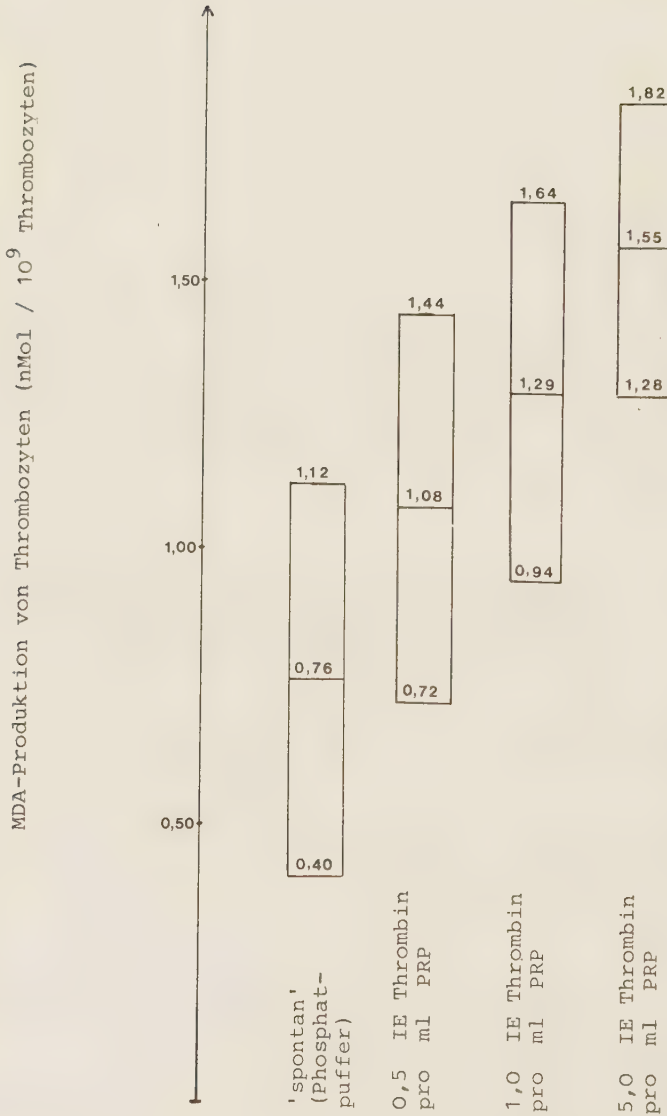
Wir untersuchten die Stimulierbarkeit der MDA-Produktion von Thrombozyten in Abhängigkeit von der zugeführten Thrombinmenge. Wir arbeiteten mit 500 μ l-Proben (PRP) und stellten Thrombinkonzentrationen von 0,5 IE, 1,0 IE und 5,0 IE pro ml PRP her. Bei allen Messungen bestimmten wir parallel einen als 'Spontanwert' bezeichneten Ansatz, bei dem die Thrombinlösung durch Phosphatpuffer ersetzt war. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Abbildung 5 zeigt die entsprechenden Normbereiche ($\bar{x} \pm 2s$).

Da wir bei den vorangegangenen Untersuchungen über die Erstellung einer Mikromethode festgestellt hatten, daß die Werte bei dieser Bestimmung insgesamt niedriger ausfielen, stimulierten wir die MDA-Produktion der Thrombozyten hierbei mit einer Thrombinmenge, die einer Konzentration von 10 IE Thrombin pro ml PRP entsprach (siehe Tabelle 5).

Tabelle 6: Stimulation der MDA-Produktion von Thrombozyten
(nMol/ 10^9 Thrombozyten) in Abhängigkeit von der
Thrombinkonzentration (500 μ l-Proben)

Thrombinkonzentration in IE/ml PRP	Mittelwert	Standardabweichung	Stichprobenumfang
	$\bar{x}$	s	n
'Spontan'	0,76	0,18	18
0,5 IE	1,08	0,18	10
1,0 IE	1,29	0,17	18
5,0 IE	1,55	0,14	18

Abbildung 5 : Stimulation der MDA-Produktion von
Thrombozyten in Abhängigkeit von der
Thrombinkonzentration
(500 μ l-Proben) ($\bar{x} \pm 2s$)



3.2. MDA-Produktion von Thrombozyten und weitere Thrombozytenfunktionstests bei 19 Kindern mit Hämophilie A

3.2.1. Thrombin-induzierte MDA-Produktion von Thrombo- zyten

Wir untersuchten 19 Kinder mit Hämophilie A (unter Verwendung von 500µl-Proben), wobei wir Werte ohne Thrombininduktion ('Spontanwerte') und solche nach Induktion mit 1 IE und 5 IE Thrombin pro ml PRP bestimmten.

In Tabelle 7 sind die Werte der MDA-Produktion von Thrombozyten unserer Patienten aufgeführt und in Tabelle 8 anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen den Werten von gesunden Probanden gegenübergestellt. Abbildung 7 veranschaulicht diese Gegenüberstellung. Bei den Kindern mit Hämophilie fällt besonders die große Streuung der gemessenen Werte auf, während die Mittelwerte sich von denen der Normalpersonen nur geringfügig unterscheiden. Abbildung 7 läßt jedoch die Tendenz erkennbar werden, daß bei zunehmender Stimulierung der MDA-Produktion von Thrombozyten unsere Patienten schwächer auf den Thrombinreiz ansprechen als die gesunden Probanden. Anhand von Einzelbeobachtungen läßt sich diese Annahme weiter stützen. So unterschriften ohne Thrombininduktion ('Spontanwert') lediglich zwei der kranken Kinder mit ihren Werten den Normbereich ($\bar{x} \pm 2s$), nach Induktion mit 1 IE und 5 IE Thrombin pro ml PRP waren es jedoch schon fünf und

schließlich sieben Patienten, die diese Auffälligkeit zeigten. Eine vergleichbare Tendenz war an der oberen Normgrenze nicht festzustellen.

Bei sechs Patienten prüften wir, ob sich kurze Zeit nach einer Substitution mit Faktor VIII:C-haltigen Konzentraten Einflüsse auf die MDA-Produktion von Thrombozyten erkennen ließen. Dazu entnahmen wir unseren Patienten vor und fünf Minuten nach der Substitution Blut zur Untersuchung. Die Ergebnisse (Tabelle 9) zeigen eine hohe Übereinstimmung, sodaß eine unmittelbare Wirkung der Substitution auf die MDA-Produktion der Thrombozyten nicht angenommen werden kann.

Tabelle 7: Thrombin-induzierte MDA-Produktion von Thrombozyten (nMol/10⁹ Thrombozyten) bei Patienten mit Hämophilie A (n=19)

Patient	'Spontanwerte' (Phosphatpuffer)	1 IE Thrombin pro ml PRP	5 IE
1	0,95	1,30	1,75
2	0,37	0,67	0,92
3	1,11	1,49	1,64
4	0,61	1,26	1,56
5	0,60	0,88	1,25
6	0,61	1,19	1,50
7	0,39	0,53	0,72
8	0,62	1,27	1,26
9	0,83	1,21	1,70
10	0,69	0,97	1,21
11	0,77	1,15	1,34
12	0,59	0,61	0,89
13	0,51	1,38	1,85
14	0,50	1,47	1,55
15	0,71	1,51	1,65
16	1,01	1,33	1,46
17	0,49	0,93	1,17
18	1,33	1,86	1,99
19	1,41	1,89	1,99
$\bar{x}$	0,74	1,21	1,44
s	0,30	0,38	0,36

Tabelle 8 : Gegenüberstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen bei der MDA-Produktion von Thrombozyten bei Normalpersonen (n=19) und Patienten mit Hämophilie (n=19)

		Normalpersonen		Patienten mit Hämophilie A
'Spontanwert' (Phosphatpuffer)		$\bar{x}$	s	
		0,76	0,18	0,74 0,30
1 IE Thrombin pro ml PRP		$\bar{x}$		
		1,29	0,17	1,21 0,38
5 IE Thrombin pro ml PRP		$\bar{x}$		
		1,55	0,14	1,44 0,36

Abbildung 7 : MDA-Produktion von Thrombozyten bei Kindern
mit Hämophilie A und Normalpersonen
in Abhängigkeit von der Thrombinkonzen-
tration (500µl-Proben)

$(\bar{x} \pm 2s)$

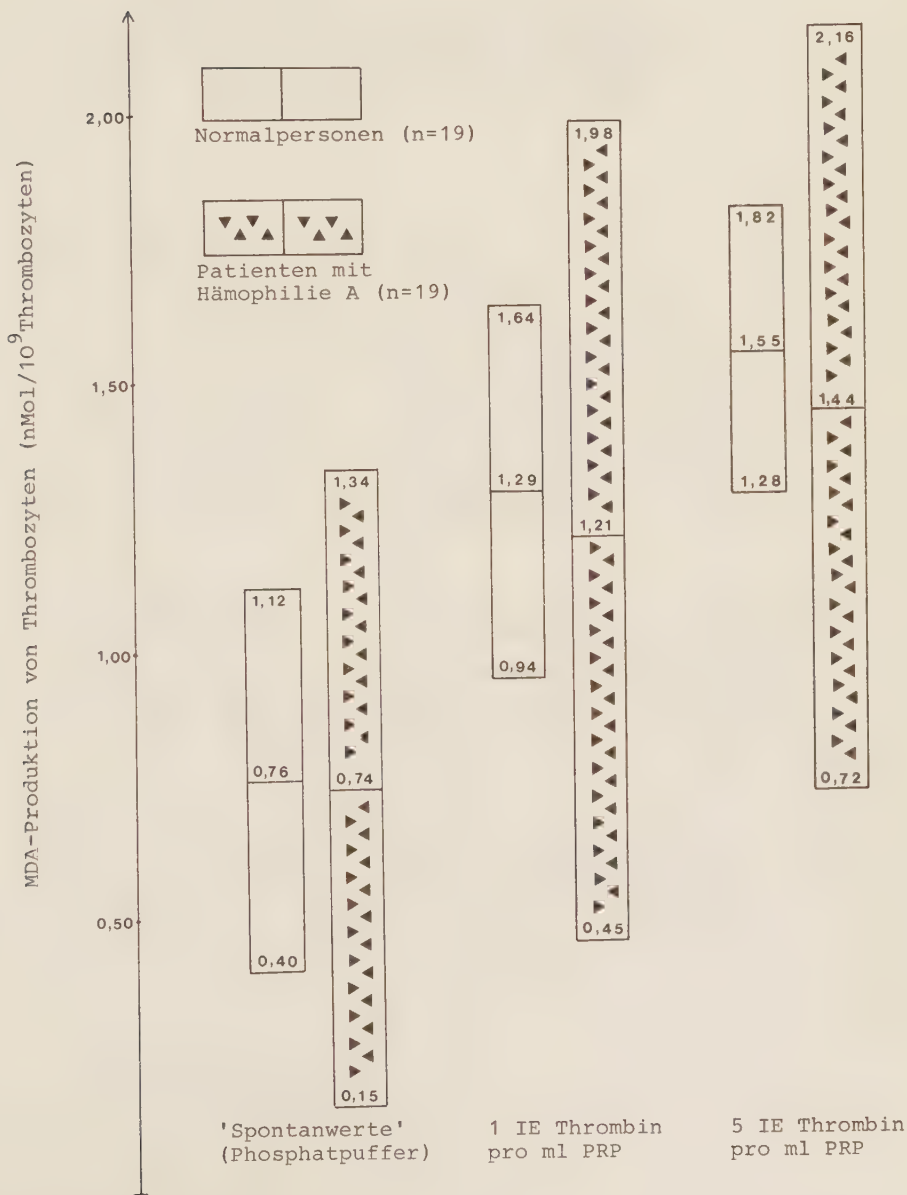


Tabelle 9: Thrombin-induzierte MDA-Produktion von Thrombozyten (nMol/10⁹ Thrombozyten) bei sechs Patienten mit Hämophilie vor und fünf Minuten nach Substitution mit Faktor VIII-haltigen Konzentraten

Patient		"spontan"	1 IE Thrombin/ml PRP		5 IE Thrombin /ml PRP	
			nMol	MDA / 10 ⁹ Thrombozyten		
1	vor		1,11	1,49		1,64
	nach		0,92	1,42		1,58
2	vor		0,61	1,28		1,56
	nach		0,45	1,06		1,46
3	vor		0,60	0,88		1,25
	nach		0,53	0,87		1,18
4	vor		0,51	1,38		1,85
	nach		0,54	1,56		1,92
5	vor		0,71	1,51		1,65
	nach		0,84	1,32		1,56
6	vor		0,49	0,93		1,17
	nach		0,36	0,84		1,13

3.2.2. Thrombozytenfunktionstests bei Hämophilie A

Parallel zur Untersuchung der MDA-Produktion von Thrombozyten erfolgte die Durchführung von Thrombozytenfunktionstests nach den bereits angegebenen Methoden (siehe 2.2.2.). Wir bestimmten:

Thrombozytenzahl,
Retention,
Retraktion,
Ausbreitung,
Aggregation (ADP, Thrombin, Kollagen, Ristocetin) und
Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit.

Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Insgesamt fällt, wie schon bei der MDA-Produktion der Thrombozyten beobachtet, die große Streubreite der Ergebnisse von unseren Patienten mit Hämophilie A im Vergleich zu den entsprechenden Normalwerten gesunder Probanden auf.

Thrombozytenzahl

Die Thrombozytenzahl war bei unseren Patientenkollektiv signifikant⁺ vermindert. Der Mittelwert lag im Vergleich zum Normalkollektiv um 70.000 Thrombozyten niedriger. Vier Kinder hatten Werte unter 150.000 Thrombozyten/ μ l (n=19).

Retention

Auch die Ergebnisse der Retention waren signifikant⁺ erniedrigt. Neun von 19 Patienten unterschritten den Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$). Auffallend groß war die Streubreite der Ergebnisse bei den Kindern mit Hämophilie.

+ ($\alpha < 0,05$ im WILCOXON-TEST)

Retraktion

Die Retraktion fiel in allen Fällen normal aus.

Ausbreitung

Auch bei der Ausbreitung zeigten die Thrombozyten der Kinder mit Hämophilie A deutliche Abweichungen von der Norm. Der Median unterschied sich signifikant⁺ von dem an einem gesunden Kollektiv ermittelten. Die Streubreite der Ergebnisse war auch bei dieser Thrombozytenfunktionsprüfung auffallend groß.

+ ($\alpha < 0,05$ im WILCOXON-Test)

Tabelle 10: Ergebnisse der Thrombozytenfunktionstests bei Kindern mit Hämophilie A (n.19)

TEST	NORMALWERT		PATIENTEN		ZAHLE DER PATHOLOGISCHEN FÄLLE*	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	vermindert	erhöht
Thrombozytenzahl ($\times 10^3/\mu l$)	282,1*	50,0	214,0	60,4	4	-
Retention (%)	94,7	2,4	87,4	11,8	9	-
Retraktion (%)	92,2	1,3	93,0	1,5	-	-
Ausbreitung (%)	77,5	1,25	74,2	5,4	10	5
Aggregation (%) mit ADP						
(1 Min.)	60,0	6,0	60,6	14,2	3	3
(3 Min.)	67,0	10,0	77,0	12,2	-	4
(5 Min.)	69,0	14,0	78,7	12,1	-	1
Thrombin						
(1 Min.)	75,0	13,0	43,4	23,4	12	-
(3 Min.)	80,0	9,0	57,0	36,5	9	4
(5 Min.)	80,0	9,0	77,0	23,1	4	7
Kollagen						
(2 Min.)	65,0	10,0	45,0	22,7	9	-
(5 Min.)	80,0	10,0	79,6	11,6	-	-
Ristocetin						
(1 Min.)	74,0	10,0	71,4	22,8	6	9
(3 Min.)	84,0	10,0	72,8	29,8	7	8
(5 Min.)	86,0	10,0	72,3	29,1	7	7
Plättchenfaktor-3- (spontan)	28,7	6,8	49,3	15,9	-	14
Verfügbarkeit (%)	31,9	2,0	31,4	21,8	8	4
(STYPVEN-Methode) ●	15,5	5,1	16,7	13,0	1	2
(Verkürzung)	17,0	7,0	16,1	17,6	-	1

* Angegeben wurden Ergebnisse außerhalb des 2s-Bereiches

● Die Werte wurden anhand eines eigenen Kollektivs gewonnen

● n = 20

Aggregation

Unterschiedlich fiel die Reaktion auf die Induktoren ADP, Thrombin, Kollagen und Ristocetin bei der Thrombozytenaggregation (photometrische Messung) aus. Die Werte, die nach Stimulation mit den einzelnen Induktoren gewonnen wurden, korrelierten auch nicht eng miteinander ($r > 0,3$).

Bemerkenswert ist die verzögerte Reaktion der Thrombozytenaggregation nach Induktion von THROMBIN und KOLLAGEN. Nach einer Einwirkungszeit von einer Minute liegen die Werte bei unseren Patienten im Mittel um 30% niedriger als bei gesunden Probanden, während sich dieser Unterschied nach fünf Minuten praktisch ausgeglichen hat.

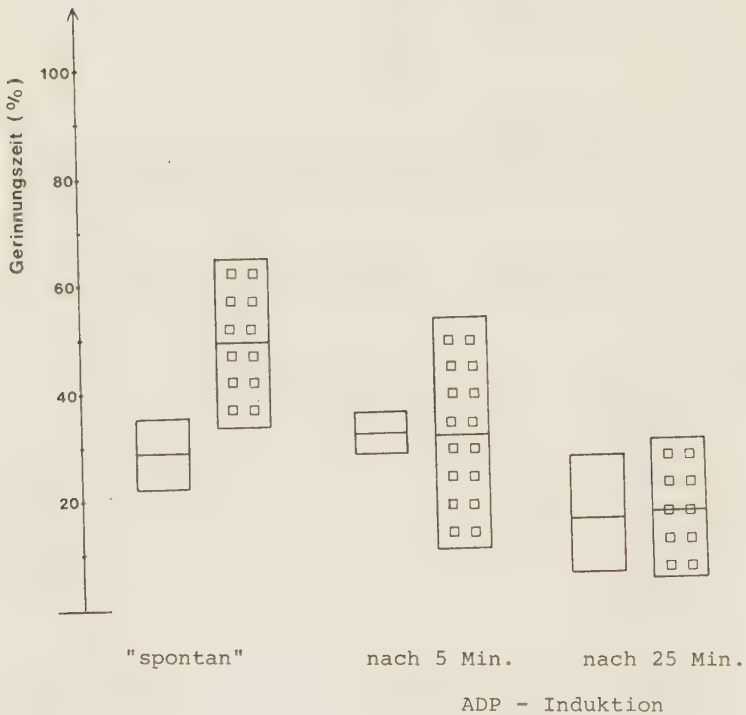
Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation zeigt nach kurzer Einwirkungszeit des Reagens keine Unterschiede zwischen den Werten unserer Patienten und gesunden Probanden. Nach drei und nach fünf Minuten fallen die Werte der Kinder mit Hämophilie jedoch deutlich höher aus. Die Streubreite der Ergebnisse ist im Gegensatz zu den mit Thrombin und Ristocetin induzierten Aggregationen kleiner als im Normalkollektiv.

Die mit Ristocetin induzierte Aggregation zeigt bei unseren Patienten fast keine Reaktion auf den Induktor. Nach fünf Minuten liegt der Mittelwert nur unbedeutend über dem nach einer Minute ermittelten Wert. Die Streubreite ist enorm groß.

Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit

Die Meßwerte (Gerinnungszeit) der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit ohne Zugabe von ADP fallen bei unseren Patienten im Mittel fast doppelt so hoch wie im Normalkollektiv aus, woraus gefolgert werden kann, daß die Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit ohne Zugabe von ADP zum Versuchsansatz (PRP) um die Hälfte verringert ist. Bei der Messung der Gerinnungszeit überschreiten 14 von 20 Patienten die obere Grenze des Normalbereichs ($\bar{x} + 2s$). Nach Zugabe von ADP ist dieser deutliche Unterschied nicht mehr festzustellen. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, bestehen zwischen den Mittelwerten beider Kollektive nach fünf und nach 25 Minuten Einwirkungszeit von ADP auf die Thrombozyten kaum nennenswerte Unterschiede, und die nach fünf Minuten um ein Vielfaches größere Streubreite der Werte bei der Hämophilie ist nach 25 Minuten auf etwa die gleiche Größe wie im Normalkollektiv zurückgegangen.

Abbildung 8 : Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit bei
Kindern mit Hämophilie im Vergleich
zu Normalpersonen
 $(\bar{x} \pm 2s) \quad (n:20)$



normal



Hämophilie

3.3. Bestimmung plasmatischer Gerinnungsfaktoren

Bei den untersuchten Kindern mit Hämophilie A fielen die Partielle Thromboplastinzeit (PTT) und der Prothrombinverbrauchstest erwartungsgemäß pathologisch aus.

Die Ergebnisse der Thromboplastinzeit (Quick) lagen im Normbereich.

Auch die Bestimmung der Faktoren II, V und VII ergab normale Werte.

Die Restaktivität von Faktor VIII:C war bei keinem unserer Patienten unter 1% vermindert. Bei sieben Kindern lag die Aktivität unter 3%, bei 10 Kindern zwischen 3% und 10% und in drei Fällen zwischen 10% und 20%.

3.4. Korrelationen

Zwischen dem Schweregrad und der Häufigkeit der Blutungen einerseits und der im Zusammenhang mit der Prostaglandinsynthese stehenden MDA-Produktion der Thrombozyten andererseits besteht nach unseren Untersuchungen bei der Hämophilie A kein Zusammenhang.

Wir prüften auch, ob zwischen der Faktor VIII:C-Aktivität und der MDA-Produktion der Thrombozyten bei unseren Patienten eine Beziehung besteht. Abbildung 9 zeigt das Scattergramm. Der Korrelationskoeffizient für das gesamte Kollektiv fiel sehr gering aus, so daß ein Zusammenhang nicht vermutet werden kann. Betrachtet man Abbildung 9, so fallen aber zwei

willkürlich voneinander trennbare Punktwolken auf, für die wir einzeln die Korrelationskoeffizienten bestimmten. Beide Werte fielen hoch aus ($r_1=0,89$, $p_1 < 0,05$; $r_2=0,89$, $p_2 < 0,01$).

Es muß an einem größeren Kollektiv geklärt werden, ob die durch diese willkürliche Einteilung gefundene Beziehung zwischen der Faktor VIII:C-Aktivität und der MDA-Produktion von Thrombozyten besteht und ob die Patienten mit Bluterkrankheit aufgrund dieses Kriteriums in zwei Untergruppen aufgeteilt werden können.

Geht man von einer Heterogenität unseres Patientenkollektivs in dieser Hinsicht aus, so sind die folgenden Korrelationen nicht zulässig (siehe Tabelle 12 und 13). Jedoch kommt ihnen großes Interesse zu, falls die nach Tabelle 9 vorgenommene Unterteilung unserer Patienten in zwei Gruppen auf Zufall beruhte.

Allerdings ist zu beachten, daß aufgrund der p-Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) keine Signifikanz postuliert werden darf, da alle Untersuchungen am gleichen Patientenkollektiv ausgeführt wurden, Zusammenhänge zwischen den beurteilten Kriterien nicht auszuschließen sind und daher die Signifikanz erst auf einem vielfach kleineren Niveau von p (Irrtumswahrscheinlichkeit) erwiesen werden kann. Jedoch erlaubt der p-Wert eine Aussage über die Güte der Korrelation und ist daher angegeben worden.

Wie aus Tabelle 12 und 13 zu ersehen ist, erwiesen sich die Zusammenhänge zwischen der MDA-Produktion der Thrombozyten und der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation sowie zwischen der MDA-Produktion von Thrombozyten und der Verkürzung der Gerinnungszeit unter ADP-Einfluß bei der Messung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit als bedeutsam.

Bei der zuerst genannten Beziehung war der Korrelationskoeffizient (r) negativ und die p-Werte waren kleiner oder gleich $p=0,05$. Mit den oben genannten Einschränkungen bedeutet dies, daß bei der Hämophilie A die MDA-Produktion von Thrombozyten um so größer ausfällt, je geringer die Ristocetin-induzierte Aggregation ist und umgekehrt.

Die Zunahme der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit unter ADP-Einfluß korreliert positiv mit der MDA-Produktion von Thrombozyten ($r=0,44$; $p=0,05$).

Tabelle 11 : Korrelation zwischen der Faktor VIII:C-
Aktivität und der MDA-Produktion von
Thrombozyten

Faktor VIII:C- Aktivität (%)	Thrombin-induzierte (5 IE/ml PRP) MDA-Produktion von Thrombozyten (nMol/10 ⁹ Throm- bozyten
---------------------------------	---

(Probenvolumen: 500 µl)

1,1	1,50
1,8	1,64
1,9	1,70
1,9	1,75
3,6	1,85

4,2	0,72
4,8	1,17
5,0	0,92
7,8	1,46
8,0	1,25
8,5	1,21
9,0	1,65
10,2	1,55
10,3	1,26
16,0	1,99
20,0	1,99

Bei drei Patienten war es nicht möglich, MDA-Werte und Faktor VIII:C-Bestimmung gleichzeitig durchzuführen.

MDA-Produktion von Thrombozyten

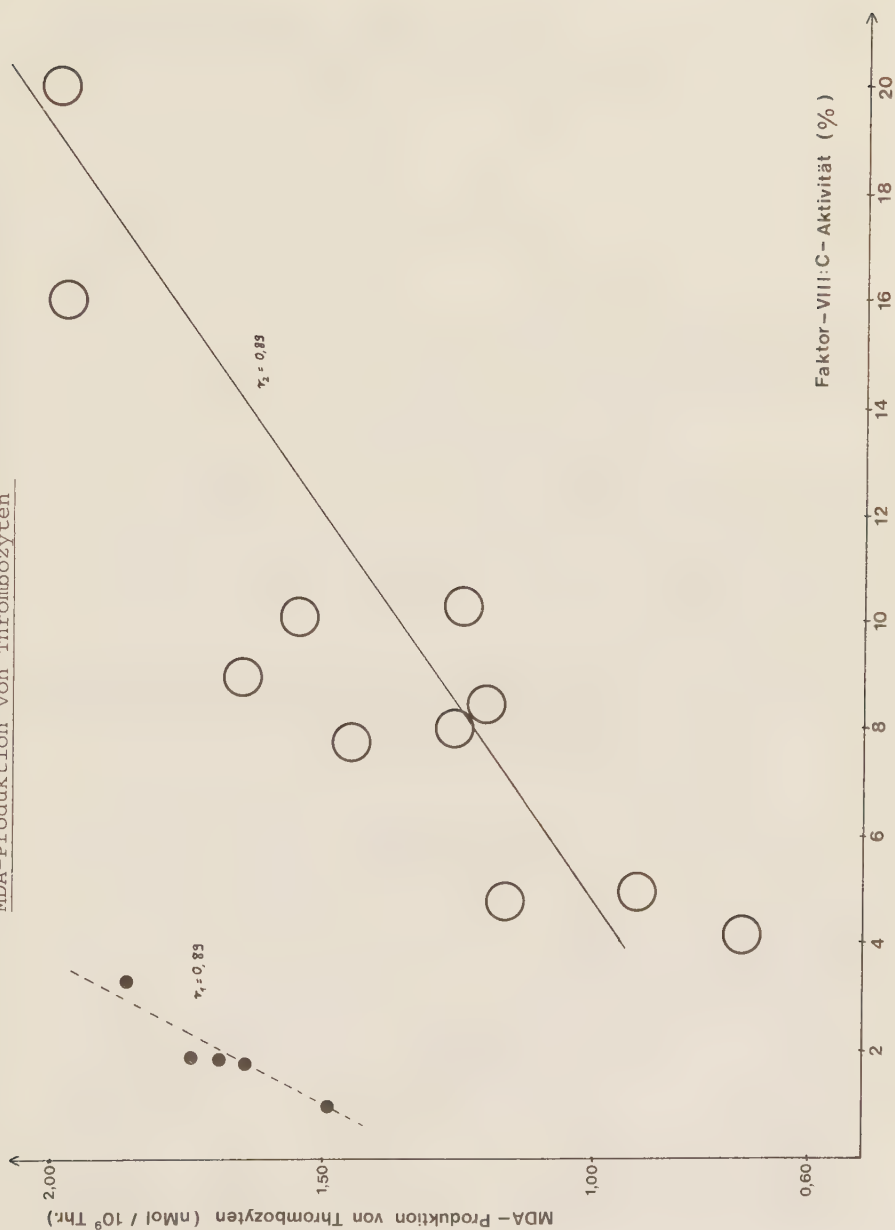


Tabelle 12 : Korrelation mit negativem Vorzeichen zwischen der MDA-Produktion von Thrombozyten und anderen Thrombozytenfunktionstests

TEST	MDA-Produktion von Thrombozyten			
	'Spontanwert'		5 IE Thrombin/ml	
	r	p	r	p
Aggregation mit Ristocetin				
(1 Min.)	-0,42	0,04	-0,43	0,03
(3 Min.)	-0,44	0,03	-0,39	0,05
(5 Min.)	-0,47	0,03	-0,41	0,04
Thrombin				
(1 Min.)			-0,28	0,12
(5 Min.)			-0,16	0,26
Retention	-0,28	0,13	-0,17	0,24
Thrombozytenzahl	-0,15	0,27	-0,12	0,32

Tabelle 13 : Korrelationen mit positivem Vorzeichen zwischen der MDA-Produktion von Thrombozyten und anderen Thrombozytenfunktionstests

TEST	MDA-Produktion von Thrombozyten			
	'Spontanwert'		5 IE Thrombin/ml	
	r	p	r	p
Verkürzung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit			+0,44	0,05
Aggregation mit ADP				
(1 Min.)	+0,28	0,13	+0,33	0,10
(3 Min.)	+0,29	0,13	+0,19	0,23
(5 Min.)	+0,29	0,13	+0,21	0,20
Kollagen				
(2 Min.)	+0,26	0,13	+0,15	0,30
(5 Min.)	+0,17	0,30	+0,16	0,30
Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit (ADP)				
(5 Min.)			+0,27	0,16
(25 Min.)			+0,23	0,20

4. DISKUSSION

4.1. Zur Bestimmungsmethode der MDA-Produktion von Thrombozyten

Die MDA-Produktion von Thrombozyten wurde von verschiedenen Autoren (49,36,63) mit verschiedenen Versuchsansätzen durchgeführt. Wir richteten uns weitgehend nach dem Vorgehen von STUART und Mitarb.(63).

Abgesehen von der Verringerung des Probenvolumens scheint uns ein wesentlicher Unterschied unseres Vorgehens im Vergleich zu dem von STUART und Mitarb. darin zu bestehen, daß wir mit großer Sorgfalt den Thrombozytenpfropf nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren von der Röhrchenwand lösten und verquirrten. Hierdurch erklären sich wahrscheinlich unsere bedeutend höheren Werte. Einen Vergleich der Ergebnisse zeigt Tabelle 14. Die Gegenüberstellung beschränkt sich auf Meßergebnisse, die mit 0,5 IE und mit 1,0 IE Thrombin pro ml PRP erzielt wurden, da STUART und Mitarb. keine "Spontanwerte" und keine Werte mit höheren Thrombinkonzentrationen erstellten.

Tabelle 14 : Vergleich unserer Meßergebnisse mit denen von STUART und Mitarb.(63)
(nMol MDA pro 10^9 Thrombozyten)

Stichproben-		Thrombinkonzentration pro ml PRP			
umfang		0,5 IE		1,0 IE	
n		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
unsere Werte (2,0ml-Proben)	10	1,19	0,19	1,31	0,15
Werte nach STUART u.Mitarb.	8	0,30	0,12	0,42	0,02

Unwahrscheinlich erscheint uns die geringe Standardabweichung bei STUART und Mitarb. nach Induktion mit 1 IE Thrombin pro ml PRP im Vergleich zu dem von uns ermittelten Wert und ferner im Vergleich zu dem von STUART und Mitarb. angegebenen Wert für die Stimulation mit 0,5 IE Thrombin pro ml PRP. Bildet man bei STUART und Mitarb. den 2s-Bereich, so liegt die untere Grenze für den ersten Wert (0,5 IE Thrombin/ml PRP) bei $0,06 \text{ nMol}/10^9$ Thrombozyten. Nach unseren Erfahrungen ist in diesem Bereich der Nachweis einer Thrombin-induzierten MDA-Produktion von Thrombozyten kaum noch möglich.

Den gleichen Mangel wie die Ergebnisse von STUART und Mitarb. weisen die Werte von KEENAN und Mitarb. (36) auf. Die Spannweite (Range) für die "Spontanwerte" beträgt dort 0,00 bis $0,85 \text{ nMol}/10^9$ Thrombozyten. Es muß davon ausgegangen werden, daß auch bei KEENAN und Mitarb. nicht immer der Nachweis der MDA-Produktion von Thrombozyten gelang.

Dagegen beträgt bei unseren Werten die untere Grenze des 2s-Bereiches für die "spontane" MDA-Produktion von Thrombozyten (kein Thrombinzusatz) $0,50 \text{ nMol}/10^9$ Thrombozyten (2,0ml-Proben). Daß diese hohen Werte nicht auf einer Verunreinigung unserer Reagenzien beruhen, konnten wir dadurch beweisen, daß wir nach Hemmung der MDA-Produktion von Thrombozyten durch Acetylsalicylsäure Werte um $0,10 \text{ nMol}$ pro 10^9 Thrombozyten erhielten.

Die Ergebnisse von OKUMA und Mitarb. (49) stimmen am ehesten mit unseren überein. Jedoch ist durch einen verschiedenen Versuchsansatz und die unterschiedliche Berechnung der Ergebnisse (Prozentangaben) die

Vergleichbarkeit eingeschränkt. OKUMA und Mitarb. wählten die prozentuale Berechnung der Ergebnisse, da ihre "Absolutwerte" eine zu große Streubreite zeigten. Die "spontane" MDA-Produktion von Thrombozyten, die ohne einstündige Inkubation der Thrombozyten ermittelt wurde, hat eine Spannweite (Range) von 0,39 bis 0,81 nMol/10⁹ Thrombozyten. Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichungen wurden von den Autoren nicht angegeben. Unsere Ergebnisse unterscheiden sich von denen der genannten Untersucher dadurch, daß sie höher liegen und die Nachweisbarkeit der 'spontanen' MDA-Produktion von Thrombozyten sicher gelingt.

Außerdem konnten wir mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen die MDA-Produktion von Thrombozyten deutlich stimulieren, wobei die Streubreite der Ergebnisse im Vergleich zu den 'Spontanwerten' nicht zunahm (siehe dazu Abbildung 5). Betrachtet man die Mittelwerte unserer Versuchsserien, so beträgt die MDA-Produktion von Thrombozyten, bezogen auf den 'Spontanwert', bei einer Thrombinkonzentration von

0,5	IE /ml	PRP	gleich	150%,
1,0	IE /ml	PRP	gleich	166%,
5,0	IE /ml	PRP	gleich	200%,
10,0	IE /ml	PRP	gleich	228%.

Diese Zahlen belegen eindeutig die Abhängigkeit der MDA-Produktion der Thrombozyten von der Höhe der Thrombinkonzentration und zeigen, wie auch Abbildung 5 veranschaulicht, das Ausmaß der von uns erreichten Stimulation.

Wir untersuchten ferner, ob die Lagerung (1 Stunde) der Plasmaproben bis zum Meßbeginn bei unterschiedlichen Zimmertemperaturen (20°C und 25°C) einen Einfluß auf die Meßergebnisse der MDA-Produktion von Thrombozyten hat. Da sich zwischen den ermittelten Werten beider Versuchsreihen kein signifikanter Unterschied ergab, zeigt sich die Methode als nicht störanfällig gegen geringe Schwankungen der Zimmertemperatur und läßt uns die Aufbewahrung der Proben (PRP) bei 4°C, wie sie von OKUMA und Mitarb. (49) vorgenommen wurde, in einem Zeitraum von einer Stunde als unnötig erscheinen.

Wie es für die Anwendung der Methode in der Pädiatrie notwendig war, verringerten wir das Probenvolumen auf ein Viertel (500µl) der bei STUART und Mitarb.beschriebenen Größe (2,0ml) und erprobten darüber hinaus eine Mikromethode (200µl). Wir verglichen die Ergebnisse statistisch mit dem Vorgehen bei Verwendung von 2,0ml-Proben (Makromethode). Bei der Reduktion des Probenvolumens von 2,0ml auf 500µl PRP ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse, sodaß wir diesen Ansatz für unsere Untersuchungen an Patienten mit Hämophilie heranzogen.

Unsere positiven Erfahrungen mit diesem methodischen Vorgehen veranlaßten uns, eine Mikromethode (200µl) zur Messung der MDA-Produktion von Thrombozyten zu entwickeln.

Eine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen bei Verwendung mit 2,0ml-Proben ergab sich nicht, wie wir es bei der Reduktion des Probenvolumens auf 500µl PRP feststellen konnten. Die Werte fielen bei der Mikromethode

generell niedriger aus. Wir vermuten, daß hierfür die Schwierigkeiten beim Lösen des sehr kleinen Plättchenpfropfes eine Rolle spielen.

Obwohl die Ergebnisse der Mikromethode im Vergleich zum Vorgehen mit 2,0 ml-Proben niedriger ausfielen, korrelierten sie hochsignifikant miteinander. Dadurch stellte sich die Mikromethode als durchführbar und ihre Ergebnisse als aussagekräftig heraus.

Neben der geringeren Belastung des Patienten ermöglicht es die Mikromethode Messungen der MDA-Produktion von Thrombozyten schon bei Säuglingen durchzuführen. Hiermit wird dieser Methode ein erweitertes Anwendungsgebiet eröffnet.

4.2. Zu den Untersuchungsergebnissen bei Patienten mit Hämophilie A

Obwohl zahlreiche Untersucher gezeigt haben, daß bei der Hämophilie neben der Verminderung der Faktor-VIII:C-Aktivität auch Störungen der Thrombozytenfunktionen vorliegen (siehe Tabelle 1), hat diese Erkenntnis anders als beim von-Willebrand-Jürgens-Syndrom bisher wenig Aufmerksamkeit gefunden.

Neben der erhöhten physikalischen Resistenz (osmotisch, Kälte) wurde auf einen verzögerten Ablauf der Agglutinatbildung und einen verspäteten Gestaltwandel der Blutplättchen bei Hämophilie hingewiesen (siehe Tabelle 1).

Entsprechend fanden wir bei unseren eigenen Untersuchungen eine verzögerte Reaktion der Blutplättchen bei der durch Thrombin bzw. durch Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation.

Ferner konnten wir die von CALL (11) berichtete Verminderung der Plättchenadhäsivität bei Hämophilie bestätigen, wobei wir einen signifikant niedrigeren Ausfall der Meßergebnisse bei unseren Patienten als bei Normalpersonen verzeichneten. Fast die Hälfte der Untersuchungen zur Retention von Thrombozyten (Methode nach HELLEM II) fiel pathologisch aus, woraufhin wir die Bedeutung dieses Tests als sicheres Unterscheidungskriterium zur Abgrenzung der Hämophilie von dem von-Willebrand-Jürgens-Syndrom in Frage stellen müssen.

Es zeigte sich darüber hinaus, daß die Fähigkeit der hämophilen Thrombozyten, sich an fremden Oberflächen auszubreiten, signifikant verschlechtert war.

Als häufigste Thrombozytenfunktionsstörung bei Patienten mit Hämophilie A stellte sich die verminderte Verfügbarkeit des Plättchenfaktor 3 dar. Diese Beobachtung ist mit den Untersuchungen von KUNZ (39) vereinbar, der bei der Hämophilie A eine Veränderung im Phospholipidkomplex der Blutplättchen nachweisen konnte. Auch WALSH und Mitarb. (73-77) hatten bereits darauf hingewiesen, daß bei der Hämophilie die von der Oberfläche der Blutplättchen ausgehende gerinnungsfördernde Aktivität (zu der auch Plättchenfaktor 3 gehört) vermindert ist.

Da in letzter Zeit Erkenntnisse gewonnen wurden, die im Zusammenhang mit der Prostaglandinsynthese, Plättchenfreisetzungsreaktion (release reaction), Thrombozytenaggregation und Gefäßweite stehen, bemühten wir uns, durch die Optimierung der Malonyldialdehyd-Bestimmung einen Test zur Verfügung zu haben, um bei den von uns untersuchten Kindern mit Hämophilie etwaige Störungen der Prostaglandinsynthese erfassen zu können.

Die Freisetzung von Arachidonsäure u.a. durch Kollagen und Thrombin aus dem Phospholipoidpool der Thrombozyten führt über ein spezifisches Enzymsystem zur Bildung von zyklischen Endoperoxiden, die ihrerseits oder durch ihre Folgeprodukte, die Thromboxane, die Freisetzung von ADP, Ca^{++} und Serotonin aus Granula der Thrombozyten verursachen. Wahrscheinlich bewirken die zyklischen Endoperoxide bzw. Thromboxane nicht direkt, sondern über die Freisetzungsreaktion (release reaction) die Aggregation der Thrombozyten. Vermutlich kommt dabei dem ADP eine große Bedeutung zu (8). Neben der essentiellen Rolle, die die zyklischen Endoperoxide und Thromboxane für die Thrombozytenaggregation spielen, bewirken sie eine Vasokonstriktion. Von den zyklischen Endoperoxiden leitet sich auch das Prostacyclin (PGX, PGI) ab, das als Antagonist die Aggregation hemmt und zur Vasodilatation führt (56). So fördert die Hemmung der Prostacyclinsynthese die Bildung weißer Plättchenthromben (8). Da Malonyldialdehyd als Nebenprodukt im Stoffwechsel der zyklischen Endoperoxide und Prostaglandine entsteht, läßt sich durch seine Bestimmung einerseits die Verfügbarkeit von Phospholipoiden der Blutplättchen, insbesondere Arachidonsäure, sowie andererseits

das Ausmaß der Prostaglandinsynthese von Thrombozyten indirekt bestimmen.

Bei unseren Untersuchungen an Kindern mit Hämophilie zeigte sich die Tendenz, daß bei steigender Stimulierung der MDA-Produktion von Thrombozyten durch Thrombin die Ergebnisse im Vergleich zu gesunden Probanden zunehmend niedriger ausfielen. Dies ist in Zusammenhang mit den Beobachtungen zu bringen, daß bei der Hämophilie die Thrombozyten einen verminderten Gehalt an Phospholipoiden aufweisen (39), was auch mit der von uns beobachteten Verminderung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit in Einklang zu bringen ist. Dementsprechend korrelierte die MDA-Produktion von Thrombozyten positiv mit der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeitskinetik.

Neben den zahlreichen Veränderungen der Thrombozytenfunktionen bei der Hämophilie A, wie sie von uns und anderen Autoren beschrieben wurden, wiesen die Experimente von PAVLOVSKY und Mitarb. (51) und MARCSEK und Mitarb. (41) erstmals auf einen Zusammenhang zwischen Faktor VIII und den beobachteten Thrombozytenveränderungen hin.

So berichteten PAVLOVSKY und Mitarb., daß die pathologisch erhöhte Resistenz von Thrombozyten bei der Hämophilie A durch Transfusion von Frischplasma aufgehoben werden konnte.

MARCSEK und Mitarb. konnten zeigen, daß durch die Infusion von Faktor-VIII-Kryopräzipitaten das Thrombelastogramm (TEG) von Patienten mit Hämophilie zwar leicht gebessert, aber erst durch Waschen der Thrombozyten und anschließender Infusion von Kryopräzipitaten eine Normalisierung des TEG-Befundes erzielt werden konnte.

Es ist erstaunlich, daß diese Ergebnisse, die schon in den Jahren 1966 und 1970 veröffentlicht wurden, kein breiteres Echo gefunden haben.

Für den von diesen Autoren beschriebenen Zusammenhang zwischen Faktor VIII und Thrombozytenfunktionen zeigten sich in unserer Studie erneut Hinweise, die aufgrund unseres kleinen Patientenkollektivs ($n=19$) mit Vorbehalt interpretiert werden müssen. So korrelierte die in diesem Zusammenhang von uns erstmals durchgeführte Messung der MDA-Produktion von Thrombozyten bei der Hämophilie A signifikant positiv mit der Faktor-VIII_C-Aktivität unserer Patienten.

Entsprechend dem Experiment von MARCSEK und Mitarb. (41) untersuchten wir, ob sich eine Steigerung der MDA-Produktion von Thrombozyten bei Patienten mit Hämophilie A durch Infusion von Faktor-VIII-haltigen Konzentraten erzielen ließe. Dieser Nachweis gelang jedoch nicht. Ob hierfür eine zu kurze Zeitspanne zwischen der Faktor-VIII-Substitution und der Blutabnahme verantwortlich zu machen ist oder ob erst durch Waschen der Thrombozyten, wie bei MARCSEK und Mitarb. (41) berichtet, eine entscheidende Veränderung der Thrombozytenfunktion hervorzurufen ist, bleibt zu prüfen.

Auch die Frage, ob die Hämophilie A in zwei unterschiedlich charakterisierbare Gruppen aufgeteilt werden kann, wie es aus dem Zusammenhang zwischen der Faktor-VIII:C-Aktivität und der MDA-Produktion von Thrombozyten bei unseren Untersuchungen möglich erscheint (siehe Abbildung 9), muß an einem größeren Kollektiv untersucht werden, als es uns zur Verfügung stand.

MARCSEK und Mitarb.(41) vermuteten, daß Faktor VIII von den Thrombozyten aus Plättchenfibrinogen, ATP und Serotonin gebildet wird. GIOVANNI-SERMANNI und Mitarb.(24) stellten einen gestörten Phosphatidyl-Serin-Metabolismus der Blutplättchen bei Patienten mit Hämophilie A fest. Diese Ergebnisse lassen an eine primäre, erbliche Genese der Thrombozytenfunktionsstörungen bei der Hämophilie A denken. Dagegen weist das Experiment von PAVLOVSKY und Mitarb.(51) (Minderung der abnormen Resistenz von Thrombozyten durch Substitution mit Frischplasma) eher auf eine sekundäre Entstehung der Thrombozytenfunktionsstörungen hin. Für diese Annahme sprechen auch unsere Untersuchungsergebnisse.

Freie Sulphydrylgruppen (SH-Gruppen) der Plättchenmembran spielen für die Aggregation eine zentrale Rolle (30,54). Auch für die MDA-Produktion von Thrombozyten konnte dies nachgewiesen werden (49). Die Oxidation der SH-Gruppen z.B. durch N-Ethylmaleimide (NEM) ruft einen starken Anstieg der MDA-Produktion von Thrombozyten hervor (49), während sie durch "Anti-Oxidativa" wie α -Tocopherol (Vitamin E) verhindert werden kann (61). Gleiches gilt für die Plättchenaggregation (18).

Einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen dem Faktor-VIII-Molekül, seiner "anti-oxidativen" Wirkung und der Plättchenfunktion gaben VERMYLEN und Mitarb.(67) : Spaltet man vom hochmolekularen Anteil des Faktor-VIII-Moleküls (Faktor VIII:R-Ag: Ristocetin-Cofaktor-Aktivität, Antigen-träger)

die sauren Sialinsäuregruppen mittels Neuraminidase ab, kommt es zu einer Steigerung der Plättchenaggregation (67). Die negative Oberflächenladung des normalerweise an die Plättchenoberfläche adsorbierten Faktor VIII:R-Ag (35) stellt wahrscheinlich einen Schutz vor der Oxidation der SH-Gruppen dar. Der Verlust der negativen Sialinsäuregruppen des Faktor VIII:R-Ag wirkt wahrscheinlich auf diese Weise aggregationsfördernd.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich eine bemerkenswerte Interpretation unserer Ergebnisse herleiten.

Wir konnten zeigen, daß die MDA-Produktion von Thrombozyten als indirektes Maß für die Prostaglandinsynthese (siehe 1.3.) bei der Hämophilie A um so geringer ist, je größer die Ristocetin-induzierte Aggregation ausfällt. Daraus folgern wir, daß der Schutz vor einer gesteigerten Prostaglandinsynthese um so größer ist, je intakter die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität bzw. das Faktor-VIII:R-Ag-Molekül ist. Wir vermuten, daß pathologische Formen dieses Moleküls bei der Hämophilie A für die freien SH-Gruppen der Plättchenmembran eine geringere "anti-oxidative"Schutzwirkung haben.

Demgegenüber steht der Zusammenhang zwischen der Faktor-VIII:C-Aktivität und der MDA-Produktion von Thrombozyten. Je geringer die Faktor-VIII:C-Aktivität bei unseren Patienten ausfiel, desto geringer war auch die MDA-Produktion der Thrombozyten. So scheint das quantitative und qualitative Ausmaß der Faktor-VIII:C-Aktivität wichtig für die Prostaglandinsynthese zu sein.

Die beiden Molekülkomponenten des Faktor VIII (Faktor VIII:R-Ag und Faktor VIII:C), die in einer dynamischen Verbindung miteinander stehen (38), wirken vermutlich antagonistisch, wobei möglicherweise der Faktor VIII:R-Ag die Prostaglandinsynthese hemmt, während sie durch Faktor VIII:C gefördert wird. Wir vermuten, daß u.a. durch das Zusammenspiel und die Intaktheit dieser beiden Molekülkomponenten das Ausmaß der Prostaglandinsynthese beeinflußt wird. So könnte bei der Hämophilie auch die große Streubreite bei der Bestimmung der MDA-Produktion von Thrombozyten im Vergleich zu den Ergebnissen bei gesunden Probanden durch eine Störung beider Faktor-VIII-Komponenten und/oder durch eine Störung in ihrem funktionellen Zusammenwirken erklärt werden.

Die bei der Hämophilie A in fast allen Thrombozytenfunktionstests aufgetretene im Vergleich zu gesunden Probanden erheblich größere Streubreite der Ergebnisse ließe sich auch dadurch erklären, daß die große Zahl von Fremdeiweißinfusionen, wie sie bei der Substitutionstherapie unvermeidlich sind, zu einer Adsorption von Fremdeiweiß an die Thrombozytenmembran mit nachfolgender Funktionseinschränkung geführt haben könnte. So ist denkbar, daß Häufigkeit und Dauer der Substitution sowie der Abstand zu der zuletzt durchgeführten Behandlung bestimmende Faktoren für das Ausmaß der Thrombozytenfunktionsveränderung darstellen könnten.

Auch wenn sich bei der Hämophilie kein allen Patienten gemeinsamer Defekt der Blutplättchenfunktion nachweisen ließ, so gibt doch die von uns beobachtete Häufigkeit der Thrombozytenfunktionsstörungen Anlaß zu der Vermutung,

daß auch diese Störungen der Plättchenfunktion sich in einigen Fällen klinisch manifestieren können und daß die beschriebene 'paradoxe Blutungsneigung' bei der Hämophilie, d.h. das Auftreten von Blutungen unter der Substitutionsbehandlung, durch Funktionsstörungen der Blutplättchen aufgrund von Fremdeiweißadsorption erklärt werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Anlehnung an STUART und Mitarb.(63) führten wir die Messung der Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten durch. Wir optimierten die Methode und verringerten das Probenvolumen von ursprünglich 2,0ml auf 200µl (Mikromethode), sodaß die Anwendung in der Pädiatrie möglich wurde. Mit der modifizierten Meßmethode konnten von uns auch sehr kleine Malonyldialdehyd-Konzentrationen sicher bestimmt werden. In Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration wiesen wir eine deutliche Steigerung der MDP-Produktion von Thrombozyten nach.

Bei unseren Untersuchungen von Patienten mit Hämophilie A stellten wir folgende Veränderungen der Thrombozytenfunktion fest:

1. Verminderte Thrombozytenzahl
2. Retention und Ausbreitung vermindert
3. Verzögerte Reaktionsbereitschaft der Thrombin- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation sowie der 'spontanen' Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit
4. Leichtere Erschöpfbarkeit
 - a) der MDA-Produktion von Thrombozyten bei starker Stimulation durch Thrombin
 - b) der Ristocetin-induzierten Aggregation bei längerer Einwirkungsdauer des Reagens.

Neben Störungen der Thrombozytenfunktionen bei der Hämophilie A fiel bei unseren Untersuchungen die große Streubreite der Ergebnisse in allen Thrombozytenfunktionstests auf, die oft bei den Hämophilie-Patienten mehr als doppelt so groß wie im Normalkollektiv war. Zur Erklärung dieser Phänomene entwickelten wir zwei Hypothesen.

Die erste fußt auf der positiven Korrelation zwischen der Faktor-VIII:C-Aktivität und der Malonyldialdehyd-Produktion der Thrombozyten und zweitens auf der negativen Korrelation zwischen der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation und der Malonyldialdehyd-Produktion der Thrombozyten.

Mit der Messung der Malonyldialdehyd-Produktion der Thrombozyten läßt sich indirekt die Syntheseaktivität für die Bildung zyklischer Endoperoxide, Thromboxane und Prostaglandine nachweisen (16), die in engem Zusammenhang mit der primären Hämostase stehen. Aufgrund der Korrelationen der Faktor-VIII-Komponenten mit der Malonyldialdehyd-Produktion der Thrombozyten vermuten wir einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein und der Intaktheit der Faktor-VIII-Komponenten und der primären Hämostase.

VERMYLEN und Mitarb.(67) zeigten, daß nach künstlicher Abspaltung von negativ geladenen Gruppen vom Faktor-VIII:R-Ag-Molekül die Plättchenaggregation gesteigert war.

Die negativen Gruppen des an die Thrombozyten adsorbierten Faktor VIII:R-Ag könnten einen Schutz vor der Oxidation membranständiger Sulphydryl-Gruppen (-SH) darstellen. Es ist bekannt, daß die Oxidation dieser SH-Gruppen die Prostaglandinsynthese und nachfolgend die Aggregation der Thrombozyten fördert (18,49,54,61).

Möglicherweise liegt bei der Hämophilie ein Defekt am Faktor-VIII:R-Ag-Molekül vor, der erklärt, daß, je stärker vermindert die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität ist, die Prostaglandinsynthese (MDA) und Bildung aggregationsfördernder Stoffe gesteigert ist. Wie VERMYLEN und Mitarb.(67) ebenfalls zeigten, ist nach Rekombination des Neuraminidase-behandelten Faktor VIII:C (Abspaltung negativ geladener Gruppen) mit Faktor VIII:C die aggregationsfördernde Wirkung des defekten Faktor VIII:R-Ag noch weitgehender verstärkt.

Dem entspricht unsere Beobachtung, daß die MDA-Produktion (Prostaglandinsynthese) um so größer ist, je mehr Restaktivität an Faktor VIII:C vorhanden ist (positive Korrelation).

Da die beiden Molekülkomponenten des Faktor VIII in einer dynamischen Verbindung miteinander stehen (38), ließe sich daraus ableiten, daß qualitative und quantitative Veränderungen der beiden Komponenten oder eine Störung in ihrem funktionellen Zusammenwirken das Ausmaß der Thrombozytenfunktionsbeeinträchtigung bestimmen und somit die große Streubreite der Werte erklären.

Die zweite Hypothese, mit der die Störungen der Thrombozytenfunktionen und die große Streuung der Werte bei der Hämophilie erklärt werden könnte, geht davon aus, daß die große Zahl an Fremdeiweißinfusionen im Rahmen der Substitutionstherapie Veränderungen der Thrombozytenmembran hervorruft. Die Streuung der Ergebnisse bei der Untersuchung der Thrombozytenfunktionen würde hiernach durch Häufigkeit und Abstand zur letzten Substitution bestimmt werden.

Für diese Annahme spricht die Beobachtung von MARCSEK und Mitarb.(41), daß das Waschen der Thrombozyten eine deutliche Funktionssteigerung der Blutplättchen bewirkt.

Nach unseren Untersuchungen ist bei einem Großteil der Patienten mit Hämophilie A die primäre Hämostase gestört, wobei Beziehungen zwischen dem Faktor VIII und der primären Hämostase möglich erscheinen. Die Bestimmung der Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten hat sich für unsere Untersuchungen als empfindlicher und aussagekräftiger Test bewährt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Benthaus, J. Über die Retraktion des Blutgerinnsels
Thromb.Diath.Haemorrh.3 (1959) 311

- 2 Bernheim, F. The reaction between thiobarbituric acid and oxidation products of certain lipids
Bernheim, M.C.C.
Wilbur, K.M.
J.Biol.Chem. 174 (1947) 257

- 3 Beutel, P. SPSS
Küffner, H. Statistik-Programmsystem für die Sozialwissenschaft nach N.N.Nie et al.
Rock, E.
Schubö, W. . Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1976

- 4 Boom, M. van den Prüfung der osmotischen Resistenz der Thrombozyten bei Säuglingen und Kindern aller Altersstufen, bei Hämophilen und deren Konduktorinnen
Med.Dissertation, Düsseldorf 1962

- 5 Borchgrevink, C.F. Acquired prolonged bleeding time in in hemophilia A and B
in: Proceedings of the 7th Congress of the European Society of Hematology
London 1959, Part II (1960) 814

- 6 Born, G.V.R. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets
J.Physiol. 162 (1962) 67

- 7 Born, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosinediphosphate and its reversal
Nature 194 (1962) 927

- 8 Bourgain, R.H. Inhibition of PGI₂ (prostacyclin) synthesis in arterial wall enhances the information of white platelet thrombi in vivo
Haemostasis 7 (1978) 252

- 9 Breddin, H. Zur Klinik der Thrombozytenfunktionsstörungen unter besonderer Berücksichtigung der Ausbreitungsfähigkeit der Thrombozyten an silikonisierten Glasflächen
Bürck, K.H.
Thromb.Diath.Haemorrh. 12(1964) 269

- 10 Brüster, H. Die Erkennung hämophiler Konduktoren
rinnen mit Hilfe des osmotischen
Resistenztests der Blutplättchen
Dtsch. Med. Wochenschr. 87 (1962) 2588
- 11 Call, K.E.
Mull, M.M.
Hathaway, W.A. Platelet function in classic
(AHF-deficiency) haemophilia: Report
of a case with defectiv platelet
function
Blood 33 (1969) 26
- 12 Dahle, L.K.
Hill, E.G.
Holman, R.T. The thiobarbituric acid reaction
and the autoxidation of polyunsaturated
fatty methyl esters
Arch. Biochem. Biophys. 98 (1962) 253
- 13 Deutsch, E. Hämorrhagische Diathesen
in: Lehrbuch der Inneren Medizin
Hrsg. R. Gross, P. Schölmerich
Schattauer Verlag, Stuttgart-
New York, 1977 S. 179
- 14 Donabedian, R.K.
Nemerson, Y. Fatty acid oxidation by human platelets
and its stimulation by thrombin
Am. J. Physiol. 221 (1972) 1283
- 15 Feissly, R.
Lüdin, H. Microscpe par contrastes du phase
(III. Application à l'Hematologie)
Rev. Hémat. 4 (1949) 481
- 16 Flower, R.J.
Cheung, H.S. Quantitativ determination of prostaglandins
and malonyldialdehyd formed
by arachidonate oxigenase (prostaglandin
synthetase) system of bovine
seminal vesicle
Prostaglandins 4 (1973) 325
- 17 Flower, R.J. Prostaglandins and related compounds
Agents Actions (Suppl.) 3 (1977) 99
- 18 Fong, J.S.C. Alpha-Tocopherol: Its inhibition on
human platelet aggregation
Experimenta 32 (1976) 639
- 19 Fonio, A. Über die Morphologie und den Gestalt-
wandel der hämophilen Thrombozyten
Schweiz. Med. Wochenschr. 86 (1956) 1439

- 20 Fonio,A. Über das Verhalten der Thrombozyten bei den Hämophilien und ihren Konduktorinnen
Schweiz.Med.Wochenschr. 89 (1959) 1026
- 21 Fukami,M.H. Thrombin-induced oxigen consumption, malonyldialdehyd formation and serotonin secretion in human platelets
Biochim.Biophys.Acta 428 (1976) 253
- 22 Gadner,H. Thrombinfunktionsstörung während der hochdosierten Substitutionstherapie bei Hämophilie A
Odenwald,E. Jarofke,R. Rehm,H.
Klin.Wochenschr.55 (1977) 1165
- 23 Gerrard,J.M. The influence of prostaglandin endoperoxides on platelet ultrastructure
White,J.G.
Am.J.Pathol. 80 (1975) 189
- 24 Giovann-Sermanni,G. Phosphatidylserin metabolism in normal and hemophylic human plasma
Principe,D.del' Tricoli,D. Sabetta,G.
Clin.Chim.Acta 49 (1973) 211
- 25 Gordon,L. Effects of prostaglandins E₁,E₂ and D₂ on platelet aggregation: variation with animal species and ionized calcium concentration
Intyre,D.E.
Br.J.Pharmacol. 55 (1975) 259
- 26 Granström,E. Biosynthesis of prostaglandins in:Prostaglandins and Thromboxanes
Session of the international school of pharmacology, Erice (Scicily)1976
Ed.B.Ferruccio,B.Samuelsson,G.P.Velo
- 27 Gryglewski,R.J. Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (Prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides
Bunting,S. Moncada,S. Flower,R.J. Vane,J.R.
Prostaglandins 12 (1976) 685
- 28 Hamberg,M. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformation of arachidonic acid in human platelets
Samuelsson,B.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71 (1974) 3400
- 29 Hardisty,R.M. Platelet aggregation and the availability of platelet factor 3
Hutton,R.A.
Br.J.Haematol. 12 (1966) 764

- 30 Harrison,M.J.G.
Emmons,P.R.
Mitchell,J.R.A. The effect of sulphydryl and enzyme inhibitors on platelet aggregation in vitro
Thromb.Diath.Haemorrh.16 (1966) 122
- 31 Hathaway,W.E.
Mahasandana,C.
Clarke,J.
Humbert,J.R. Padoxical bleeding in intensively transfused hemophiliacs.Alteration of platelet function
Transfusion (Philadelphia) 13, (1973) 6
- 32 Hellem,A.J. Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. A study with a new modification of the glass bead filter method
Scand.J.Haematol. 7 (1970) 374
- 33 Holmson,H.
Day,J.
Stormorken,H. The blood platelet release reaction
Scand.J.Haematol.(Suppl.) 8 (1969) 3
- 34 Jürgens,R. Die Blutplättchen und ihre Bedeutung für die Blutungsneigung und Thrombinbildung
Dtsch.Med.Wochenschr. 77 (1952) 1265
- 35 Karpatkin,M.H.
Karpatkin,S. In vivo and in vitro binding of faktorVIII to human plateles
Thromb.Diath.Haemorrh. 21 (1969) 129
- 36 Keenan,P.J.
Wharton,J.
Shephard,A.J.N.
Bellingham,A.J. Defectiv platelet lipid peroxidation in myeloproliferative disorders:A possible defect of prostaglandin synthesis
Br.J.Haematol. 35 (1977) 275
- 37 Kohn,H.J.
Liversedge,N.J. New aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphin, ergotamin, epinephrin and menadione
J.Pharmacol.&Exper.Therap. 82 (1945) 292
- 38 Koutts,J.
Gude,N.
Firkin,B.G. The dynamic interrelationship between faktorVIII and von Willebrand faktor
Thromb.Res. 8 (1976) 533

- 39 Kunz,F.
Rampl,E.
Holzknecht,F. The role of phospholipoids in haemophilia A
Klin.Wochenschr. 50 (1972) 1058
- 40 Malmsten,C.
Hamberg,M.
Svensson,J.
Samuelsson,B. Physiological role of an endoperoxide in human platelets: Hemostatic defect due to platelet cyclooxygenase-deficiency
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72 (1975) 1446
- 41 Marcsek,M.
Tilsner,V.
Busch,H. Zur Ätiologie der Hämophilie. Neue Aspekte des Faktor-VIII-Mangels
Münch.Med.Wochenschr. 30 (1970) 1377
- 42 Marx,R.
Ibrom,H.
Stanisławski,F. Die Färbung folien-und glasadhärenter ausgebreiteter Thrombozyten. Ein Verfahren zur verbesserten lichtmikroskopischen Thrombozytenanalyse
Blut 6 (1960) 335
- 43 Miyamoto,T.
Ogino,N.
Yamamoto,S.
Hayaishi,O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsome
J.Biol.Chem. 251 (1976) 2629
- 44 Moncada,S.
Gryglewski,J.R.
Bunting,S.
Vane,J.R. A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (Prostaglandin X) which prevents platelet aggregation
Prostaglandins 12 (1976) 715
- 45 Mustard,J.F.
Rowell,H.C.
Murphy,E.A. Platelet economy (Platelet survival and turnover)
Br.J.Haematol. 12 (1966) 1
- 46 Niessner,H. Messung der Plättchenadhäsivität mit einer modifizierten Form der Hellem-II-Methodik unter besonderer Berücksichtigung des von Willebrand-Jürgens-Syndrom
Thromb.Diath.Haemorrh. 27 (1972) 434
- 47 Okuma,M.
Steiner,M.
Baldini,M.B. Lipid peroxidation in aging platelets
Blood 34 (1969) 712

- 48 Okuma,M.
Steiner,M.
Baldini,M.B. Studies on lipid peroxides in platelets. I Method of essay and effect of storage
J.Lab.Clin.Med. 75 (1970) 283
- 49 Okuma,M.
Steiner,M.
Baldini,M.B. Studies on lipid peroxides in platelets. II Effect of aggregating agents and platelet antibody
J.Lab.Clin.Med. 77 (1971) 728
- 50 Patton,S.
Kurtz,G.W. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation
J.Diary Science 34 (1951) 669
- 51 Pavlovsky,M.
Pavlovsky,A. Study of platelet function in haemophiliacs
Thromb.Diath.Haemorrh. 20 (1966) 304
- 52 Placer,Z.A.
Cushman,L.L.
Johnson,B.C. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyd) in biochemical systems
Anal.Biochem. 16 (1966) 359
- 53 Riech,P.C.
Pfitzner,W.
Brüster,H. Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion bei Hämophilie A
Z.Kinderh. 102 (1968) 204
- 54 Robinson,C.W.
Mason,R.G.
Wagner,R.H. Effect of sulphydryl-inhibitors on platelet agglutinability
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 113 (1963) 857
- 55 Russel,F.A.
Deykin,M.S.
Deykin,D. The effect of thrombin on the uptake and transformation of arachidonic acid by human platelets
Am.J.Haematol. 1 (1976) 59
- 56 Samuelsson,B.
Folco,G.
Granström,E.
Kindahl,H.
Malmsten,C. Prostaglandins and thromboxanes: Biochemical and physiological considerations in : Advances in Prostaglandin and Thromboxan Research 4
Ed.F.Coceani, P.M.Olley
Raven Press, New York, 1978, S.1
- 57 Shen,T.Y. Prostaglandin synthetase inhibitors in: Prostaglandins and thromboxanes Session of the international school of pharmacology,Erice (Scicily) 1976
Ed.B.Ferruccio,B.Samuelsson,G.P.Velo

- 58 Slater, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury
Pion Limited, London, 1972
- 59 Smith, W.L. Oxydation of polyunsaturated acids during prostaglandin synthesis by
Lands, W.E.M. sheep vesicular gland
Biochemistry 11 (1972) 3276
- 60 Smith, J.B. Prostaglandins and precursors in
Ingberman, C.M. platelet function
Silver, M.J. Ciba Foundation Symp. 35 (1975) 207
- 61 Steiner, M. Vitamin E
Anastasi, J. An inhibitor of the platelet release reaction
J.Clin.Invest. 57 (1976) 732
- 62 Stocks, J. The susceptibility of autoxidation
Offerman, E.L. of human red cell lipids in health
Modell, C.B. and disease
Dormandy, T.L. Br.J.Haematol. 23 (1972) 713
- 63 Stuart, M.J. A simple nonradioisotope technic for
Murphy, S. the determination of platelet life
Oskey, F.A. span
N.Eng.J.Med. 292 (1975) 1310
- 64 Sutor, A.H. Jesdinsky-Buscher, C. Blutung bei Hämophilie unter massiver
Therapie mit antihämophilen Globulin
Dtsch.Med.Wochenschr. 100 (1975) 1183
- 65 Turner, S.R. Biogenesis of chemotactic molecules
Tainer, J.A. by the arachidonate lipoxygenase
Lynn, W.S. system of platelets
Nature 257 (1975) 680
- 66 Vane, J.R. Inhibitors of prostaglandin, prostacyclin and thromboxane synthesis
in: siehe 56, S.27
- 67 Vermylen, J. Faktor VIII and human platelet aggregation. III Further studies on aggregation of human platelets by neuraminidase-treated human faktor VIII
Botecchia, D.
Szpilman, H. Br.J.Haematol. 34 (1976) 321

- 68 Voss,H.v.
Petrich,C.
Tomaschoff,J.
Göbel,U. Zur Standardisierung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation
Blut 33 (1976) 89
- 69 Voss,H.v.
Frensch,G. Der Einfluß von Kontaktzeit,Durchflußvolumen, Glasperlenbeschaffenheit und Antikoagulantien auf die Thrombozytenretention
in: Erworbene Gerinnungsstörungen im Kindesalter
Hrsg.U.Göbel
Bücherei des Pädiaters, Band 78 (1977),Enke,Stuttgart,S.82
- 70 Voss,H.v.
Göbel,U.
Breuer,R.
Petrich,C.
Tomaschoff,J. Normalwerte der Thrombozytenaggregation mit ADP, Thrombin, Kollagen und Ristocetin
in: siehe 69, S.99
- 71 Voss,H.v. Präzisierung und Anwendung von Thrombozytenfunktionstests in der Kinderheilkunde
Habilitationsschrift
Westdeutscher Verlag, Düsseldorf, 1979
- 72 Voss,H.v.
Bergmann,F.
Göbel,U.
Richter,O.
Jürgens,H. Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit und Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten bei Kindern mit Hämophilie
in: Prostaglandine und Plättchenfunktion
Hrsg.H.K.Breddin
F.K.Schattauer Verlag,Stuttgart-New York (1978), S.359
- 73 Walsh,P.N. The effect of collagen and caolin in the intrinsic coagulant activity of platelets
Br.J.Haematol. 22 (1972) 393
- 74 Walsh,P.N. The role of platelets in contact phase of blood coagulation
Br.J.Haematol. 22(1972) 237
- 75 Walsh,P.N.
Biggs,R. The role of platelets in intrinsic factor Xa formation
Br.J.Haematol. 22 (1972) 743

- 76 Walsh,P.N.
Rainsford,S.G.
Biggs,R. Platelet coagulant activities and
clinical severity in haemophiliacs
Thromb.Diath.Haemorrh.29 (1973) 722
- 77 Walsh,P.N. Platelet activities and haemosta-
sis: A hypothesis
Blood 43 (1974) 597
- 78 Weissbach,G. Die Thrombozyten der Hämophilen
Folia Haematol. (Leipz.) 100,
(1973) 131
- 79 Wilbur,K.M.
Bernheim,F.
Shapire,O.W. The thiobarbituric acid reagent
as a test for the oxidation of
unsaturated fatty acids by various
agents
Arch.Biochem. 24 (1949) 305
- 80 Willis,A.L.
Vane,F.M.
Kuhn,D.C.
Scott,C.G.
Petrin,M. An endoperoxide aggregator (LASS),
formed in platelets in response
to thrombotic stimuli
Prostaglandins 8 (1974) 453

Herrn Priv. Doz.Dr.H.von Voss möchte ich meinen herzlichen Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige und hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit sagen.

Frau M.Th.Sievers danke ich für die stets hilfsbereite und überaus freundliche Unterstützung im Thrombozytenfunktionslabor.

Herrn Dr.O. Richter (Institut für Medizinische Statistik und Biomathematik, Direktor Professor Dr.J.Jesdinsky) danke ich für die Beratung in statischen Fragen.

Dem Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen danke ich für die Bereitstellung der Laborgeräte und Reagenzien.

LEBENS LAUF

Am 9. August 1953 wurde ich als zweiter Sohn des Kaufmannes Heinz Bergmann und seiner Frau Katharina, geb. Grellert, in Berlin geboren. 1973 bestand ich die Reifeprüfung an der Lilienthal-Oberschule in Berlin-Steglitz.

Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Medizin. Nach Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung wechselte ich 1975 an die Universität Düsseldorf. Hier legte ich im Frühjahr 1979 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Zur Zeit absolviere ich das Praktische Jahr an den Städtischen Krankenanstalten in Krefeld.

